



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ A STRUKTURNÍ  
ANALÝZY K CHARAKTERIZACI NATIVNÍ A  
MODIFIKOVANÉ HUMINOVÉ KYSELINY**

PHYSICOCHEMICAL AND STRUCTURAL ANALYSIS FOR CHARACTERIZATION OF NATIVE AND  
MODIFIED HUMIC ACIDS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Pavel Solanský**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

**BRNO 2019**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1465/2018  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student: **Pavel Solanský**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Spotřební chemie  
Vedoucí práce: **Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**  
Akademický rok: 2018/19

### Název bakalářské práce:

Využití fyzikálně–chemické a strukturní analýzy k charakterizaci nativní a modifikované huminové kyseliny

### Zadání bakalářské práce:

Fyzikálně–chemická a strukturní analýza nativní a methylované huminové kyseliny.

Provést literární rešerši na zadané téma.

Charakterizace huminových kyselin pomocí spektrometrických metod (UV/Vis, FTIR,  $^{13}\text{C}$  NMR a fluorescenční spektrometrie).

### Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

---

Pavel Solanský  
student(ka)

---

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.  
vedoucí práce

---

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

---

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá strukturní a fyzikálně-chemickou charakterizací nativní a methylované huminové kyseliny. Příslušné vzorky huminových kyselin, které byly izolovány z oxidovaného hnědého uhlí *Leonarditu*, byly charakterizovány pomocí termických a spektrometrických metod. Na základě provedené literární rešerše byly vybrány k určení strukturních a fyzikálně-chemických změn mezi nativní a methylovanou HK následující analytické techniky: termogravimetrie (TGA), elementární analýza (EA), molekulová absorpční spektrometrie (UV/Vis), infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), fluorescenční spektrometrie a v neposlední řadě i nukleární magnetická rezonance ( $^{13}\text{C}$  NMR). Cílem této bakalářské práce bylo nalézt rozdíly ve struktuře, a také ověřit vhodnost použitých technik k charakterizaci těchto biokoloidních látek.

## ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on structural and physicochemical characterization of native and methylated humic acid. These samples of humic acids, which were isolated from oxidized brown coal *Leonardite*, were characterized by thermal and spectrometric methods. The following analytical techniques were selected to determine the structural and physicochemical changes between native and methylated humic acid: thermogravimetry (TGA), elemental analysis (EA), molecular absorption spectroscopy (UV/Vis), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), fluorescence spectroscopy and last but not least nuclear magnetic resonance ( $^{13}\text{C}$  NMR). The aim of this bachelor thesis was to find the differences in the structure of selected humic acids and also to verify the suitability of the techniques, which were used to characterize these biocolloid substances.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Huminové kyseliny, UV/Vis spektrometrie, FTIR spektrometrie, fluorescenční spektrometrie,  $^{13}\text{C}$  NMR, TGA, elementární analýza.

## KEYWORDS

Humic acids, UV/Vis spectroscopy, FTIR spectroscopy, fluorescence spectroscopy,  $^{13}\text{C}$  NMR, TGA, elemental analysis.

SOLANSKÝ, P. *Využití fyzikálně-chemické a strukturní analýzy k charakterizaci nativní a modifikované huminové kyseliny*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019, 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
Pavel Solanský

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat všem, kteří mi při psaní této práce věnovali svůj čas.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>8</b>
2.1	Huminové látky	8
2.2	Rozdělení huminových látek	8
2.3	Vznik huminových látek	9
2.3.1	Ligninová teorie	9
2.3.2	Polyfenolová teorie	10
2.3.3	Kondenzace cukrů a aminů	10
2.4	Molekulární struktura huminových látek	10
2.4.1	Polymerní model struktury huminových látek	12
2.4.2	Supramolekulární model struktury huminových látek	13
2.5	Reaktivita huminových látek	14
2.5.1	Adsorpce huminových látek	14
2.5.1.1	<i>Pozitivní a negativní adsorpce</i>	15
2.5.1.2	<i>Vazebné interakce a mechanismy u adsorpce</i>	15
2.5.2	Komplexní a chelatační reakce huminových látek	16
2.5.2.1	<i>Komplexní reakce a koordinační sloučeniny</i>	16
2.5.2.2	<i>Význam karboxylových skupin v komplexních reakcích</i>	17
2.5.2.3	<i>Chelatační reakce huminových látek</i>	17
2.6	Využití huminových látek	18
2.6.1	Průmyslové využití	18
2.6.2	Aplikace v zemědělství	19
2.6.3	Ochrana životního prostředí	19
2.6.4	Lékařství a biomedicína	19
2.7	Současný stav	20
2.7.1	UV/Vis spektrometrie HL	20
2.7.2	Infračervená spektrometrie HL	20
2.7.3	TGA analýza HL	21
2.7.4	<sup>13</sup> C NMR spektrometrie HL	21
2.7.5	Fluorescenční spektrometrie HL	22
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>24</b>
3.1	Použité metody a přístroje	24

3.2	Elementární analýza .....	24
3.3	TGA analýza.....	24
3.4	UV/Vis spektrometrie.....	24
3.4.1	Příprava vzorků .....	24
3.4.2	Měření UV/Vis spekter.....	25
3.5	FTIR spektrometrie .....	25
3.5.1	Příprava vzorků .....	25
3.5.1.1	<i>Transmisní technika</i> .....	25
3.5.1.2	<i>Metoda DRIFT</i> .....	25
3.5.2	Měření FTIR spekter .....	25
3.6	$^{13}\text{C}$ NMR spektrometrie.....	26
3.6.1	Příprava vzorků .....	26
3.6.2	Měření $^{13}\text{C}$ NMR spekter.....	26
3.7	Ustálená fluorescenční spektrometrie .....	26
3.7.1	Příprava vzorků .....	26
3.7.2	Měření fluorescenčních spekter .....	27
<b>4</b>	<b>DISKUZE A VÝSLEDKY .....</b>	<b>27</b>
4.1	Elementární analýza .....	27
4.2	TGA analýza.....	28
4.3	UV/Vis spektrometrie.....	29
4.4	FTIR spektrometrie .....	31
4.5	$^{13}\text{C}$ NMR spektrometrie.....	33
4.6	Ustálená fluorescenční spektrometrie .....	34
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>43</b>

# 1 ÚVOD

Půdní organická hmota je nedílnou součástí půdní biomasy, která je tvořena organickými látkami, odumřelými ale i živými organismy, které spoluvytvářejí půdní edafon. Organické frakce jsou jednou z nejdůležitějších komponent půdy, a proto vzbudily velkou pozornost zejména v zemědělství, kde se značně podílely a podílí na fyzikálních, chemických a biologických změnách v půdním ekosystému. Na základě dosavadního výzkumu bylo zjištěno, že tyto organické látky mají významný vliv na růst rostlin a také na úrodnost půdy. Huminové látky (HL) jsou nedílnou součástí organické hmoty v půdě, kde vznikají v důsledku složitých aerobních mikrobiologických procesů zahrnujících chemické, fyzikální a biologické transformace převážně rostlinných a živočišných zbytků. Tento proces samovolné přeměny je často uváděn pod názvem humifikace. Lignin a jeho produkty transformace, což jsou polysacharidy, melanin, kutin, proteiny, lipidy, nukleové kyseliny, jemné částičky uhlíku atd., jsou důležitými složkami, které se účastní tohoto procesu [1; 2].

Cílem této práce je, jak již název napovídá, stanovit pomocí fyzikálně-chemických a analytických metod chemickou povahu nativní a methylované huminové kyseliny, která byla extrahována z Leonarditu. Leonardit je hnědé uhlí vyššího oxidačního stupně než je tomu u lignitu, jehož naleziště jsou situována do oblasti jihomoravské a vídeňské pánve. Je všeobecně známo, že v případě těchto kaustobiolitů nebyl doposud dokončen proces transformace na uhlí, a proto je jejich využitelnost v energetických odvětvích poněkud problematická. Jsou to rovněž přírodní materiály s nejvyšším podílem huminových látek. Mezi hlavní odlišnosti Leonarditu od ostatních materiálů obsahujících huminové látky patří vysoká bioaktivita, která je dána jeho molekulární strukturou [3]. Stanovení struktury huminových kyselin je v této práci provedeno pomocí šesti instrumentálních technik, přičemž každá z nich nám přináší odlišné informace o charakteru dané kyseliny.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Huminové látky

Huminové látky jsou přírodní organické sloučeniny, jež vznikly chemickým a biologickým rozkladem organické hmoty a syntetickou činností mikroorganismů [4]. Je to rozsáhlá třída látek, které jsou definovány svou rozpustností při různých hodnotách pH a svou retencí na hydrofobních pryskyřicích [5]. Molekulová hmotnost těchto stabilních komplexních sloučenin je v rozmezí  $10^2$  až  $10^5$  Da. V přírodě se vyskytují nejčastěji v rozličných kaustobiolitech (*Leonardit*, *lignit*, *rašelina*, *kerogen* aj.) půdách a sedimentech. Mohou se však vyskytovat také v povrchové a podzemní vodě. Huminové látky obsahují heteroatomy kyslík, dusík a síru. Největší význam má kyslík, jenž je vázán v karboxylových a fenolických skupinách, dusík a síra jsou méně významné [6].

### 2.2 Rozdělení huminových látek

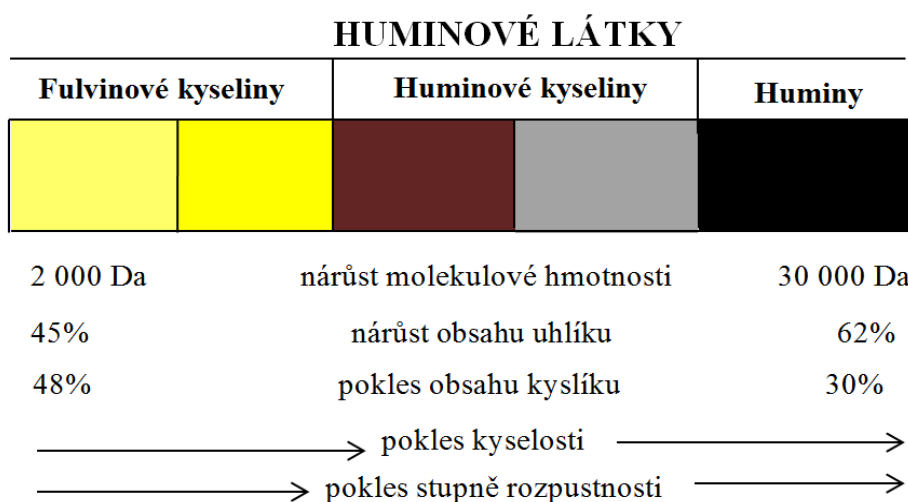
Huminové látky se dělí podle extrahovatelnosti zásadami a kyselinami na fulvinové kyseliny (FK), huminové kyseliny (HK) a huminy (HU), které se liší chemickou strukturou a molekulovou hmotností. Huminové kyseliny jsou látky nerozpustné za silně kyselých podmínek ( $\text{pH} < 2$ ). Fulvinové kyseliny jsou rozpustné jak v alkalických, tak i v kyselých roztocích. Naopak huminy jsou charakterizovány jako nerozpustné složky huminových látek [6].

Huminové kyseliny tvoří nejkvalitnější složku humusových látek. Jsou to polymery tmavě hnědé až černé barvy. Jejich základní stavební jednotkou jsou aromatická jádra fenolového nebo chinonového typu, na které jsou vázány v bočních řetězcích funkční skupiny typu:  $-\text{O}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{N}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2-$ . V centru HK se může nacházet benzen, naftalen, anthracen nebo pyridin. Funkční skupiny mohou být karboxylové ( $-\text{COOH}$ ), fenolové ( $-\text{OH}$ ), aminové ( $-\text{NH}_2$ ), methylové ( $-\text{CH}_3$ ), sulfonové ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ), ketonové ( $\text{C}=\text{O}$ ), methoxylové ( $-\text{OCH}_3$ ) a fosfátové ( $-\text{PO}_3\text{H}_2$ ) [7].

Fulvinové kyseliny se nejčastěji vyskytují v adsorbované formě. Mají charakteristické žluté zbarvení, jsou méně kondenzované než huminové kyseliny a jsou rozpustné ve vodě a ve zředěných kyselinách. Jsou charakteristické především pro kyselé půdy. Díky svým vlastnostem, především svým obsahem kyselých funkčních skupin, jsou známé jako nejreaktivnější frakce huminových látek ve vodním prostředí [7].

Huminy jsou humusové látky nerozpustné v alkalických roztocích. Vykazují vysoký stupeň kondenzace a polymerizace. Jsou více dehydrované než huminové kyseliny a společně s humusovým uhlím obsahují 20–30 % z celkového množství dusíku v půdě. Jsou to karbonizované organické látky, jež jsou pevně vázané na minerální podíl půdy a nedají se získat ani několikanásobnou extrakcí bázemi z dekalcinované půdy. Huminy mají černé zbarvení [7].





Obrázek 1 Fyzikálně-chemické vlastnosti huminových látek a jejich rozdělení [1]

## 2.3 Vznik huminových látek

Tvorba huminových látek je jedním z nejzajímavějších a zároveň jedním z nejméně pochopených aspektů humusové chemie. Existuje několik způsobů a teorií, které popisují tvorbu huminových látek během dekompozice rostlin a živočišných pozůstatků v půdě. Klasická teorie popularizovaná Walksmanem spočívá v tom, že huminové látky představují modifikovaný lignin (dráha 4). Další teorie, která je více upřednostňována současnými autory, upřednostňuje mechanismus zahrnující chinony a nazývá se polyfenolová teorie (dráha 2 a 3). Poslední způsob vzniku huminových látek je pomocí kondenzačních reakcí cukrů s aminy (dráha 1).

Tyto čtyři dráhy mohou probíhat ve všech půdách ale i jiných přírodních ekosystémech, avšak ne ve stejném rozsahu. Například dráha ligninu může převládat ve špatně odvodněných půdách a vlhkých sedimentech, zatímco syntéza z polyfenolů může mít značný význam v některých lesních půdách. Časté kolísání teploty, vlhkosti a ozáření v suchozemských povrchových půdách může zase zvýhodňovat syntézu humusu pomocí kondenzace cukrů s aminy [2].

### 2.3.1 Ligninová teorie

Po mnoho let se předpokládalo, že huminové látky pocházejí z ligninu. Lignin je podle Walksmanovy ligninové teorie považován za hlavní zdroj půdních huminových látek. Podle této teorie dochází k ději, kdy jsou během mikrobiální degradace rozloženy méně stabilní molekuly, zatímco stabilnější části biopolymerů jsou rozloženy neúplně, nebo zůstávají zachovány (např. lignin, kutin, melanin). Tyto stabilní molekuly mohou vytvořit prekurzory huminových látek.

Neúplně rozložený lignin se poté stává součástí půdního humusu a dochází k jeho modifikaci. Během modifikace ligninu dochází ke ztrátám methoxylových skupin ( $-\text{OCH}_3$ ) a zároveň dochází k tvorbě o-hydroxyfenolů a oxidaci alifatických postranních řetězců za vzniku karboxylových skupin ( $-\text{COOH}$ ). Modifikovaný materiál pak podléhá dalším

ne úplně známým změnám, díky kterým vznikají nejprve huminové kyseliny a poté fulvinové kyseliny [2].

### **2.3.2 Polyfenolová teorie**

Jak již bylo zmíněno výše, Walksmanova ligninová teorie je v dnešní době mnoha vědci považována za méně věrohodnou a zastaralou. Podle polyfenolové teorie lignin sice stále hraje důležitou roli v syntéze humusu, ale jiným způsobem, než jakým tomu bylo u ligninové teorie. Podle současných konceptů jsou chinony hlavními stavebními jednotkami, z nichž se vytvářejí huminové látky.

V tomto případě se fenolové aldehydy a kyseliny uvolňované z ligninu během mikrobiologického napadení podrobí enzymatické konverzi na chinony, které poté polymerují za přítomnosti nebo nepřítomnosti aminosloučenin, čímž se vytvoří huminové makromolekuly. Možnými zdroji fenolů pro syntézu humusu jsou lignin, mikroorganismy, nekombinované fenoly v rostlinách a třísloviny. Z těchto zdrojů jsou důležité především první dva jmenované [2].

Polyfenolová teorie byla doplněna hypotézou, podle které mohou polyfenoly vznikat z látek jiného než ligninového původu, např. celulózy a jiných polysacharidů. Některé huminové látky jsou syntetizovány z rostlinných pletiv, které lignin neobsahují, např. mechy a kapradiny [8].

### **2.3.3 Kondenzace cukrů a aminů**

Tato teorie pracuje s představou, že humus je tvořen cukry. Podle této teorie se redukující cukry a aminokyseliny, vytvořené jako vedlejší produkty mikrobiálního metabolismu, podrobí neenzymatické polymeraci za vzniku hnědých dusíkatých polymerů. Reakce je pomalá a probíhá za normálních půdních podmínek. Výhoda této teorie spočívá v tom, že díky působení mikroorganismů jsou reaktanty (cukry, aminokyseliny atd.) produkovány ve velkém množství [2].

Počáteční reakce probíhá přidáním aminu k aldehydové skupině cukru za vzniku N-substituovaného glykosylaminu. Následně se z N-glykosylaminu vytvoří N-substituovaná-1-amino-deoxy-2-ketóza. Ta poté podléhá fragmentaci a tvorbě aldehydů a ketonů s tříuhlíkatými řetězci, jako jsou acetol, diacetyl atd. N-substituovaná-1-amino-deoxy-2-ketóza podléhá zároveň také dehydrataci při které vznikají reduktony a hydroxymethylfurfuraly. Všechny tyto sloučeniny jsou vysoce reaktivní a snadno polymerují v přítomnosti aminosloučenin za vzniku produktů hnědé barvy [9].

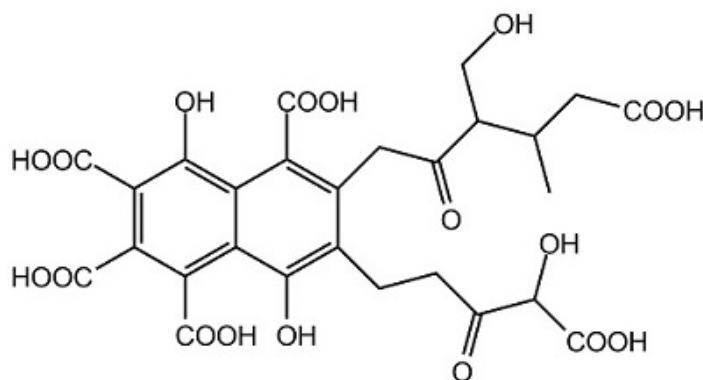
## **2.4 Molekulární struktura huminových látek**

Chemická povaha huminových látek je pravděpodobně jedním z nejčastěji diskutovaných témat ve vědě. Studií těchto makromolekul se vědci zabývají již přes 200 let, a i přes aplikace téměř všech dostupných analytických přístrojů, vyvinutých za poslední čtyři desetiletí, je znalost povahy a složení těchto látek stále omezená. Bylo zjištěno, že většina doteď používaných degradačních metod má silný vliv na původní stavební jednotky huminových látek, což následně vede k významné změně jejich struktury. Tyto analytické postupy mají tedy velice omezenou hodnotu, jelikož produkty reakce pouze částečně odráží strukturu

stavebních jednotek přítomných v dané huminové látce. Na analýzu vazeb mezi těmito stavebními jednotkami už tyto analytické postupy nestačí vůbec [10].

Huminové kyseliny jsou komplexní aromatické makromolekuly, jejichž aromatické jednotky jsou propojeny aminokyselinami, alifatickými sloučeninami, aminocukry a peptidy. Huminové kyseliny obsahují velké množství funkčních skupin, z nichž se jako nejreaktivnější jeví karboxylové a fenolové [4]. Obvykle se udává, že v molekule huminových kyselin jsou 3 až 4 karboxylové skupiny a zároveň je tam 3 až 7 fenolových skupin. Karboxylové skupiny mají poměrně silně kyselý charakter (disociační konstanty se pohybují v řádu od  $10^{-2}$  do  $10^{-5}$ ), kdežto hydroxylové skupiny mají jen slabě kyselý charakter (disociační konstanty jsou v řádu  $10^{-9}$  až  $10^{-11}$ ). Tyto dvě funkční skupiny, společně s methoxylovými, zapříčiňují slabě polární charakter huminových látek [11]. Kromě těchto funkčních skupin se v huminových kyselinách nachází také skupiny enolové, chinonové, hydrochinonové, laktonové, etherové a alkoholové. V menším množství se mohou vyskytovat také skupiny sírové, dusíkové a fosforové [7]. Huminové kyseliny různého původu se od sebe liší zastoupením funkčních skupin a bočních řetězců [11].

Fulvinové kyseliny jsou organické látky, které zůstávají v roztoku po kyselém vysrážení huminových kyselin z výluhu huminových látek. Chemická struktura molekul fulvinových kyselin je velice podobná struktuře huminových kyselin. Aromatický charakter je u fulvinových kyselin méně výrazný. Tyto kyseliny také disponují větším obsahem kyslíku v molekule, větším počtem karboxylových skupin a na rozdíl od huminových kyselin jsou lépe rozpustné ve vodě. Jsou oproti huminovým kyselinám také více disociovány, což způsobuje, že mají kyselejší charakter a jejich pH může být i nižší než 3. Fulvinové kyseliny vykazují také komplexotvorné vlastnosti [11; 12].



Obrázek 2 Přibližná struktura základní jednotky fulvokyselin (Buffle 1977) [13]

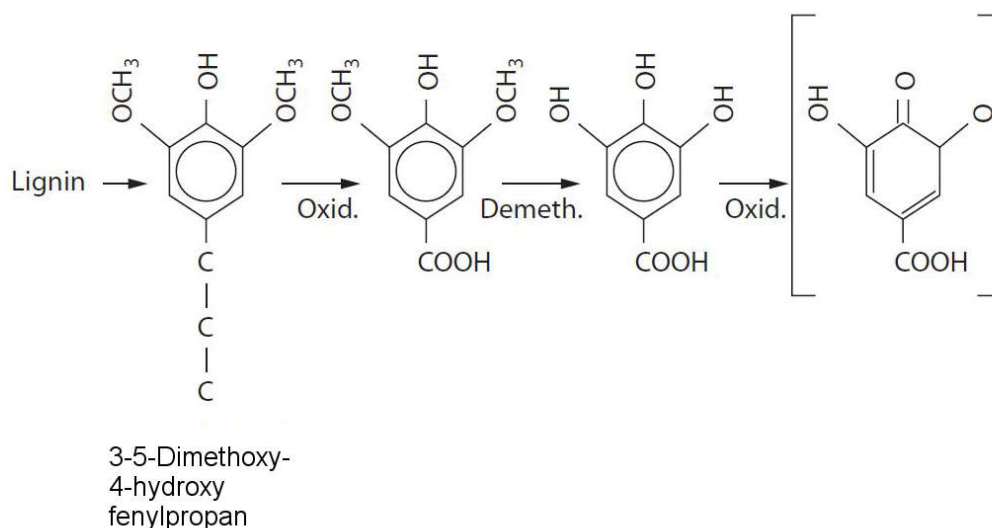
Pravděpodobně první návrhy struktury huminových kyselin byly předloženy současně Stevensonem v roce 1972 a Harworthem v roce 1973 [4]. Napříč historií pak bylo předloženo několik možných modelů struktury huminových kyselin. Zásadním problémem těchto hypotetických strukturních modelů však je, že postrádají žádoucí jednotnost a stále mezi nimi existuje spousta neshod [14]. Dlouhou dobu převládal tzv. polymerní model, jenž zobrazoval huminové kyseliny jako makromolekuly s lineární strukturou. S příchodem moderních instrumentálních analytických technik však došlo k odklonu od polymerního modelu a přešlo

se na tzv. supramolekulární model, který pohlíží na huminové kyseliny jako na supramolekuly [8].

#### 2.4.1 Polymerní model struktury huminových látek

Pozorování elektronovým mikroskopem odhalilo, že huminové kyseliny různých přírodních matric mají polymerní strukturu, která se objevuje ve formě kruhů, řetězců a klastrů. Rozměry jejich makromolekul se mohou pohybovat v rozmezí od 60 do 500 Å, což ovlivňuje typ humifikačního procesu pro danou huminovou kyselinu. Typ humifikačního procesu ovlivňuje také prostorovou strukturu huminových látek [15]. Z polymerního konceptu struktury huminových kyselin vychází celá řada strukturních modelů, ze kterých stojí za zmínku zejména Flaigův model (1975), Kleinhumpelův model (1970), Stevensonův model (1994) a také model Schnitzera a Schultena (1993) [8].

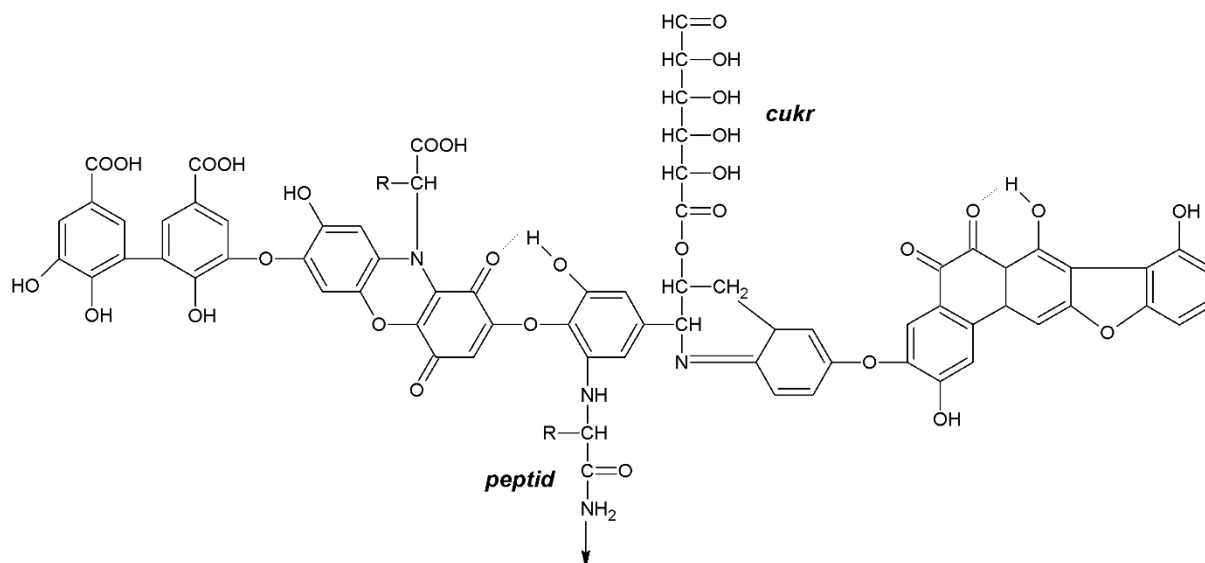
Podle Flaiga (1975) je lignin zdrojem nebo výchozím bodem pro vznik huminových a fulvinových kyselin. Předpokládá se, že je lignin rozložen degradací nebo rozkladnými reakcemi na své základní jednotky (tj. koniferilové nebo guajacylové monomery). Tyto základní jednotky ligninu podléhají oxidaci a následné demethylaci na substituované polyfenoly. Další oxidací pak vznikají chinonové deriváty. Kondenzací chinonových skupin společně s aminokyselinami a polysacharidy se pak mohou produkovat huminové látky kyselé povahy. Produkty ligninové degradace byly detekovány při hydrolýze huminových kyselin. Tato teorie je známá pod pojmem lignoproteinová teorie. Její průběh můžeme vidět na Obrázku 3 [14].



Obrázek 3 Lignoproteinová teorie dle Flaiga (1972) [14]

Stevenson (1994) byl toho názoru, že se na tvorbě komplexní struktury huminové látky mohou podílet všechny doposud zmíněné reakční mechanismy. Jde konkrétně o kondenzaci cukrů a aminů, polyfenolovou teorii a lignoproteinovou teorii. Kondenzační reakce se účastní velké množství prekurzorových molekul, což může způsobit velké množství kombinací výsledné struktury. Pro zjednodušení problému ve struktuře navrhl Stevenson tzv. koncept dimeru. Dle tohoto konceptu se jádro huminové molekuly skládá ze čtyř stavebních jednotek:

z dimeru, vytvořeného spojením dvou ligninových monomerů, z fenol-aminokyselinového komplexu, z hydrochinonu a z jednotky C6–C3 ligninu. Kombinace těchto základních stavebních jednotek vede k vytvoření velkého množství primárních struktur huminových látek [14].

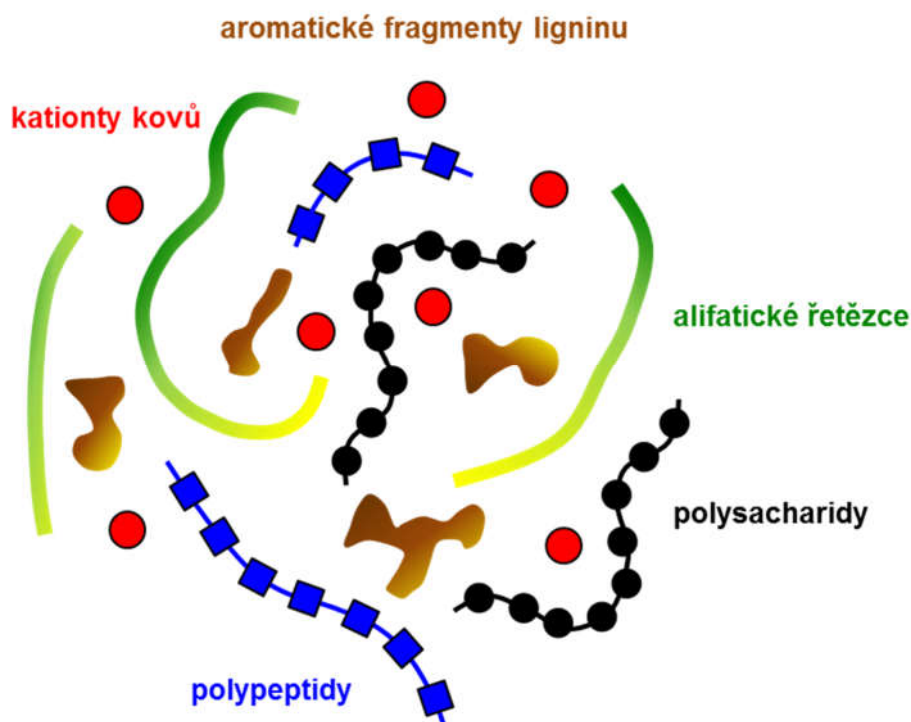


Obrázek 4 Hypotetická struktura huminové kyseliny podle Stevensona [7]

#### 2.4.2 Supramolekulární model struktury huminových látek

Supramolekulární chemie považuje chemické systémy za vícesložkové systémy, složené z atomů, iontů a odděleného počtu shromážděných molekulárních jednotek. Dále využívá slabší nekovalentní interakce, jako jsou vodíkové můstky, van der Waalsovy vazby,  $\pi$ – $\pi$  interakce a elektrostatické síly pro sdružování molekul do multimolekulárních komplexů. Tato teorie, která je poměrně nová v oblasti huminové chemie, se stala důležitou v druhé polovině 20. století kvůli jejímu přínosu ve studiu struktur proteinů a DNA [16].

Supramolekulární koncept struktury huminových látek jako první představil A. Piccolo se svými spolupracovníky v roce 2002. Jeho návrh podpořil také Simpson, který během svého výzkumu struktury huminových látek použil NMR techniky, jako je například metoda Diffusion ordered spectroscopy (DOSY). Podle Piccolovy [17] teorie si můžeme huminové látky představit jako relativně malé a heterogenní molekuly, které nejsou vázány kovalentními vazbami, ale stabilizují se slabými silami, jako jsou disperzní hydrofobní interakce (van der Waalsovy síly,  $\pi$ – $\pi$ , CH– $\pi$ ) a vodíkové můstky, jež jsou postupně důležitější při nižších hodnotách pH. Konformační strukturu huminových látek určují intermolekulární síly a samotná reaktivita huminových látek [17].



Obrázek 5 Supramolekulární model struktury huminové kyseliny podle Simpsona [8]

## 2.5 Reaktivita huminových látek

Huminové látky mají značnou schopnost interagovat téměř se všemi sloučeninami a strukturami, které se vyskytují v jejich přirozeném okolí. Jde například o organické a anorganické molekuly, minerální ionty nebo mikrobiální povrchy [4]. Díky elektrochemickým vlastnostem huminových látek a přítomnosti elektrických nábojů může docházet k řadě reakcí a interakcí. Druh elektrického náboje závisí na pH okolí, kterému je HL vystavena. Při nízké hodnotě pH a okolí se předpokládá, že molekula huminové látky vykazuje kladné náboje, které jsou důležité pro fixaci fosfátu a jiné typy interakcí s aniontovými látkami. Naopak při rozsahu pH, který je častý pro většinu přírodních ekosystémů, jsou huminové látky negativně nabitě a jsou schopné přitahovat kationty nebo adsorbovat. Pokud dojde k úplné ionizaci nebo disociaci karboxylových a fenolových skupin, jsou huminové látky schopny vytvářet komplexy s kovovými ionty, nebo s jinými složkami ať už s přírodními sloučeninami nebo s xenobiotiky.

Adsorpce i komplexní reakce probíhají důsledkem interakce mezi organickým ligandem (huminovou látkou) a jílovou micelou. V této reakci může sloužit jako můstek mezi ligandem a jílovou micelou voda nebo jakýkoliv kovový iont ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ). Tento způsob můstku mezi huminovou látkou a jílem se nazývá koadsorpce. Každá z uvedených reakcí huminových látek bude detailně popsána v následujících částech [16].

### 2.5.1 Adsorpce huminových látek

Adsorpční reakce jsou definovány jako reverzibilní a rovnovážné reakce. Někdy může proces adsorpce vést k chemickým změnám adsorbovaného materiálu. Změny jsou takové povahy, že dochází k inhibici desorpce, a proto není proces ani reverzibilní a ani v rovnováze. Tento typ adsorpce nazýváme pseudoadsorpce. Další důležitou vlastností je, že adsorpce obecně

klesá s rostoucí teplotou, což je způsobeno zvýšenou kinetickou energií molekul při vyšších teplotách, které narušují koncentrační proces.

### **2.5.1.1 Pozitivní a negativní adsorpce**

Teorie adsorpce v půdách se zabývá typem koncentrujícího materiálu na pevném a kapalném rozhraní jílových minerálů. Adsorpce se nejčastěji dělí na pozitivní a negativní. Pozitivní adsorpce je definována jako koncentrace rozpuštěných látek na jílových minerálních površích. Rozpuštěné látky obvykle snižují povrchové napětí. Na druhou stranu negativní adsorpce je proces, při kterém dochází ke koncentraci rozpouštědla na povrchu jílu a k následné koncentraci rozpuštěné látky v celkovém roztoku. (eng. *bulk solution*). V tomto případě se naopak zvyšuje povrchové napětí. Jílové minerály jsou za normálních půdních podmínek zpravidla negativně nabitě, což tedy způsobuje, že jsou kationtové protiionty vystaveny pozitivní adsorpci, zatímco anionty jsou ovlivněny negativní adsorpcí. Vzhledem k tomu, že huminové látky jsou, co se týče výskytu elektrických nábojů, velice podobné právě zmíněným jílovým minerálům, můžeme předpokládat, že budou také vykazovat stejné dva druhy adsorpčních procesů. Jak již bylo zmíněno výše, na druh elektrického náboje i na druh adsorpce huminových látek má značný vliv hodnota pH daného prostředí. Pokud je pH větší než 3, lze huminovou látku považovat za adsorbent, jehož negativní náboj přitahuje kationty pozitivní adsorpcí a současně odpuzuje anionty. Naopak když hodnota pH klesne na hodnotu menší než 3, bude náboj huminové látky kladný. To je pak stav, při kterém dochází k pozitivní adsorpci aniontů [16].

### **2.5.1.2 Vazebné interakce a mechanismy u adsorpce**

K tomu, abychom mohli lépe charakterizovat adsorpční reakce a mechanismy, je důležité mít představu o možných vazebných interakcích mezi HL a cizorodými látkami, jež jsou přítomny v zemině. Tyto vazebné interakce je možné odvodit především z doposud známých informací o struktuře [7]. Mezi síly odpovědné za adsorpční reakce patří van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, hydrofobní interakce, elektrostatické vazby, koordinační vazby a výměna ligandů. V následující části budou jednotlivé interakce podrobně charakterizovány [16].

#### *Van der Waalsovy síly*

Van der Waalsovy síly se podílejí na adsorpci neiontových nepolárních molekul, nebo částí molekul. Tyto nevazebné síly vznikají mezi dvěma dipóly, které se při přiblížení dvou molekul začnou přitahovat. Aditivní povaha van der Waalsových sil mezi atomy adsorbátu a adsorbentu může mít za následek značnou přitažlivost velkých molekul, mezi něž se řadí také huminové kyseliny. S větší vzdáleností molekul klesá vliv van der Waalsových sil. Tyto síly jsou také považovány za zvláště důležité v nepolárních organických sloučeninách a neutrálních organických látkách [16; 18].

#### *Vodíkové můstky*

Vodíkové můstky jsou zvláštním druhem interakce mezi vodíkem a silně elektronegativním prvkem (např. kyslíkem, dusíkem nebo sírou). Jedná se o nejsilnější nevazebné interakce, kvůli kterým také dochází k adsorpčním reakcím u huminových látek. Příčinou vzniku

vodíkových vazeb je přítomnost funkčních skupin u huminových látek, které obsahují vodík ve svých molekulách (např. skupiny N–H, –NH<sub>2</sub>, –OH nebo –COOH). Mezi těmito funkčními skupinami a kyslíkem, přítomným na jílových minerálních površích, dochází k tvorbě vodíkových můstků [16; 18].

#### *Elektrostatické interakce*

Tento typ interakcí nastává mezi dvěma molekulami, jež jsou opačně nabitě. V našem případě záporně nabitý povrch huminové látky tvoří tzv. vnitřní vrstvu, k níž jsou elektrostatickými a adsorpčními silami přitahovány kationty (protiionty), jejichž náboj neutralizuje náboj povrchu huminové látky a tvoří tzv. vnější vrstvu. Tento typ reakce je úzce spjat s výměnnými reakcemi, jelikož protiionty mohou být snadno vyměněny za jiné podobně nabitě ionty, které jsou považovány za tzv. výměnné kationty. Elektrostatické interakce jsou důvodem adsorpce vody, adsorpce organických sloučenin a jak již bylo zmíněno, adsorpce kationtů vedoucích k výměnným reakcím kationtů [16].

#### *Hydrofobní vazby*

Tento typ vazeb vzniká při kontaktu nepolárních skupin (např. alkylových) nesených molekulami, které se nacházejí ve vodném roztoku. Hydrofobní interakce mohou vycházet např. z působení van der Waalsových sil nebo z přesunu  $\pi$  elektronů. Tyto vazby jsou odpovědné za adsorpci nepolárních sloučenin nebo pesticidů (DDT, organochlorové insekticidy) na hydrofobních oblastech organických látek v půdě. Tímto způsobem jsou také polysacharidy adsorbovány jílovými minerály [4; 16; 18].

#### *Výměna ligandů*

Tento proces je spojen s nahrazením jednoho nebo více ligandů molekulou adsorbátu, kde adsorbátem může být anorganický ion nebo organická molekula. V obou případech však musí mít adsorbát silnější chelatační kapacitu než ligand, který má být nahrazen. Při výměně ligandu mohou jako možná místa pro adsorpci sloužit částečně chelatované přechodné kovy [16; 18].

### **2.5.2 Komplexní a chelatační reakce huminových látek**

Komplexní a chelatační reakce jsou hlavním důvodem, proč jsou huminové látky tak významné v oblasti zemědělství a životního prostředí. Díky těmto reakcím jsou huminové látky považovány za jednu z nejaktivnějších složek půdy. Vzhledem k povaze reakčních a vazebných procesů se vyskytují rozdíly mezi tvorbou komplexu a chelatací. Tyto difference budou popsány v následujících částech [12; 16].

#### **2.5.2.1 Komplexní reakce a koordinační sloučeniny**

Tvorba komplexu neboli komplexace je reakce kovového iontu se sloučeninou prostřednictvím sdílení elektronových párů. Výsledný produkt se nazývá kovová koordinační sloučenina, která může být ve formě kationtů, aniontů nebo neutrálních molekul. Při tvorbě komplexu je kov akceptorem elektronových párů, zatímco sloučenina je donorem elektronových párů. Kovový iont slouží jako centrální atom a ligandy jsou koordinovány kolem něj v první koordinační sféře. Ligand pak může být ve formě aniontu (HA<sup>-</sup>) nebo



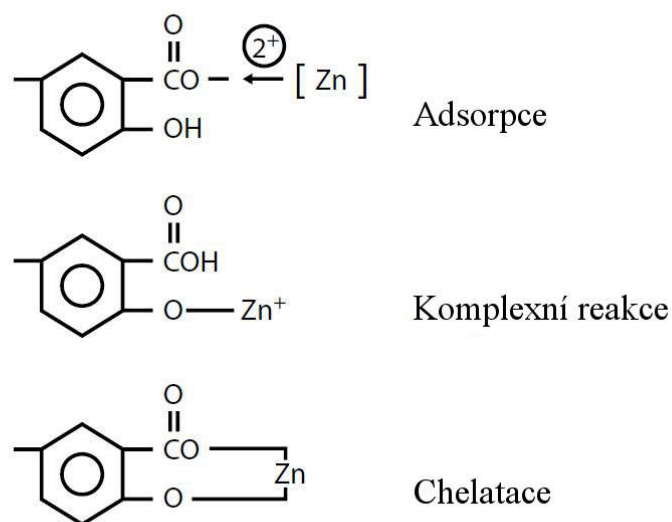
ve formě neutrální molekuly (např.  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{O}_2\ldots$ ). Počet ligandů vázaných na centrální atom závisí na koordinačním čísle kovu. Téměř každý atom kovu může sloužit jako akceptorový atom, včetně  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Au}^+$ . Nejčastější kovy, schopné komplexních reakcí, jsou však přechodné kovy např.  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  [16].

#### **2.5.2.2 Význam karboxylových skupin v komplexních reakcích**

Nedávno byla objevena hypotéza, že příčinou tvorby kovových komplexů je interakce kovu s karboxylovými skupinami huminových látek. Podle této teorie jsou karboxylové skupiny hlavním místem pro vznik komplexů v huminových látkách. Tyto funkční skupiny mohou být vázány na aromatickou nebo alifatickou strukturu HL a mohou tvořit komplexy s kovy jako jsou  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  nebo  $\text{Cu}^{2+}$ . Vysoce aromatické huminové látky, které obsahují velké množství aromatických  $\text{COOH}$  skupin, budou podle autorů (McKnight a spol.) vykazovat silná komplexní místa pro  $\text{Cu}^{2+}$ . Skupiny  $\text{COOH}$  na alifatických místech HL jsou zase podle této teorie důležité pro komplexaci zejména iontů  $\text{Ca}^{2+}$  [16].

#### **2.5.2.3 Chelatační reakce huminových látek**

Chelatace je zvláštním druhem komplexní reakce, kdy ligand může vázat kovový ion dvěma nebo více donorovými funkčními skupinami za vzniku kruhové struktury. Sloučenina, vytvořená s charakteristickým heterocyklickým kruhem, se nazývá chelát. Jestliže se na tvorbě chelátu podílí jeden ligand, sloučenina se nazývá monodentátový chelát. Pokud je chelát tvořena dvěma ligandy, pak se sloučenina nazývá bidentát atd. Na Obrázku 6 lze pak vidět rozdíly mezi adsorpcí, komplexací a chelatací mezi kovovým iontem ( $\text{Zn}^{2+}$ ) a huminovou kyselinou. Na první pohled se adsorpce zdá být velice podobná komplexní reakci, jenže je zde signifikantní rozdíl ve vazebných interakcích. K adsorpci dochází vlivem elektrostatického přitahování kationtu  $\text{Zn}^{2+}$  s negativně nabitým povrchem huminové kyseliny, zatímco komplexní sloučenina vzniká přes sdílení elektronového páru. V tomto případě je ion vázán a stává se nedílnou součástí molekuly huminové kyseliny, jak je uvedeno na Obrázku 6. Vzniklý chelát je typickým příkladem monodentátu [16].



Obrázek 6 Adsorpce, komplexace a chelatace zinku huminovou kyselinou [16]

Bylo dokázáno, že chelatační reakce jsou velmi výhodné v kyselých půdách, ve kterých je přítomnost velkého množství  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$  toxická pro růst rostlin. Huminové kyseliny mohou v půdním roztoku vázat tyto nadbytečné ionty a později je uvolnit do rostlin v menším množství podle potřeby. Vzniklé organokovové cheláty zabraňují podobným způsobem také kontaminaci podzemní vody a znečištění zemědělských půd [14].

## 2.6 Využití huminových látek

Huminové látky jsou důležitými biogeochemickými složkami povrchu Země. V současnosti mají huminové látky poměrně rozsáhlé využití, které je možné rozdělit do několika oblastí. Nejčastěji jsou huminové látky využívány v zemědělství nebo v oblasti životního prostředí. Kromě jejich tradičního použití na organická hnojiva, jsou huminové látky také využívány jako substráty pro léčivé přípravky, a také jako výchozí materiály pro syntézu specializovaných průmyslových výrobků [4; 19].

### 2.6.1 Průmyslové využití

Huminové látky jsou v průmyslu využívány např. ve stavebnictví jako aditiva cementů, která ovlivňují jejich disperzitu, reologické chování a adhezi vzniklých povrchů. Další uplatnění huminových látek lze nalézt v kožedělném průmyslu, ve kterém byly huminové látky zpočátku používány jako barvivo a později jako součást povrchové úpravy kůže. Keramický průmysl je další oblastí využití huminových látek. Zde jsou používány zejména jako přísady pro zlepšení mechanické pevnosti doposud nevypálené keramiky, nebo mohou být použity také pro přípravu kameniny. Mimoto lze také huminové látky aplikovat při výrobě plastů jako barviva Nylonu 6 a PVC plastů, nebo případně jako plastifikátorové přísady pro PVC. Huminové látky našly využití také při výrobě filtrů, které díky aktivnímu jádru s přídavkem huminové kyseliny odstraňují karcinogenní ionty chromu ( $\text{Cr}^{6+}$ ), barviv, pesticidů, fenolů a různých uhlovodíkových sloučenin z městských a průmyslových odpadních vod [8; 20].

### 2.6.2 Aplikace v zemědělství

Huminové látky mají obrovský význam v oblasti agronomie zejména proto, že výrazně ovlivňují kvalitu a produktivitu půdy. Navíc také zlepšují fyzikální vlastnosti půdy, obsah vlhkosti a vykazují vysokou výměnnou kapacitu, která je důležitá pro úrodnost půdy. V současné době se huminové látky používají jako přísady v hnojivech, především ve formě humátů, tj. solí huminových kyselin. Schopnost huminových látek tvořit cheláty (zejména s  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ ) usnadňuje příjem živin rostlinnými buňkami, čehož se využívá při klíčení a růstu rostlin. Dále huminové látky zvyšují produkci biomasy, zejména tím, že v kořenové části rostlin udržují ve vodě rozpustná organická hnojiva a snižují jejich vyluhování. Podporují také rozvoj žádoucích mikroorganismů v půdě [8; 20; 21; 22].

### 2.6.3 Ochrana životního prostředí

Hlavní úlohou huminových látek v chemii životního prostředí je odstranit toxické kovy, antropogenní organické chemikálie a další polutanty z vody, půdy a kalů. Na odstranění těžkých kovů, mezi které patří např. železo, nikl, rtuť, kadmium a měď, z vody, se osvědčily jako vhodné ionexové materiály, založené na humátu vápenatém. Obecně mají huminové látky v půdě funkci filtru, kdy zabraňují nejen již zmíněným těžkým kovům, ale i ostatním jedovatým sloučeninám, jako jsou např. PCB, radioaktivní látky či dioxiny, v přechodu do rostlin a dále do potravního řetězce. Huminové látky jsou také silnými chelátátory, vážou na sebe mykotoxiny, těžké kovy dioxiny atd. a zabraňují tak jejich vstřebávání do organismu [20; 22].

### 2.6.4 Lékařství a biomedicína

V posledním desetiletí došlo v České republice ke zvýšení zájmu o aplikaci huminových látek v lékařství a biomedicině. Farmaceutické a kosmetické využití huminových látek souvisí s jejich protizánětlivým, antivirovým, profibrinolytickým a chelatačním charakterem. Potenciál huminových látek pro tvorbu chelátů z těžkými kovy (např.  $\text{Cd}^{2+}$ ) je využit v medicíně při odstraňování těchto těžkých kovů z organismu. Díky svým antibakteriálním a antivirovým vlastnostem jsou huminové látky stále více uplatňovány v humánní medicíně. Klinické studie ukazují, že obtížně léčitelná virová respirační onemocnění, častá u dětí, jsou snadno léčena doplňkem stravy, který obsahuje extrakt fulvinové kyseliny. Mnohé studie dokazují, že huminové látky, zejména fulvinové kyseliny, mají schopnost chránit proti rakovině a virům způsobujících rakovinu. Studie také často poukazují na speciální léčebné terapie huminovými látkami, které by měly průběh této nemoci zcela zvrátit. Huminové látky rovněž příznivě ovlivňují imunitní systém a zabraňují vzniku autoimunních onemocnění např. artritidy. Jsou u nich také prokázány detoxikační, imunosupresivní a analgetické účinky. Léčebný efekt huminových látek je využíván dále také v dermatologii a balneoterapii. Používání huminových látek v medicíně a farmakologii však limituje fakt, že byla prokázána jejich toxicita pro mnoho lidských buněk. Specifický mechanismus jejich cytotoxicity však zůstává stále nejasný [8; 20].

## 2.7 Současný stav

### 2.7.1 UV/Vis spektrometrie HL

Molekulová absorpční spektrometrie je běžně používanou technikou v oblasti studia a charakterizace HL pocházejících z rozličných přírodních matric jako jsou kaustobiolity, půdy, sedimenty, sladkovodní a mořské zdroje [23]. Tato analytická technika je jednou z prvních metod, která by měla být použita k základní charakterizaci těchto biokoloidních látek, a to především díky její robustnosti a velkému množství publikací, které se touto tematikou zabývají.

Z naměřených absorpčních spekter HL lze získat tzv. absorpční koeficienty, které jsou definovány jako poměry absorbancí při vhodně zvolených vlnových délkách. Asi nejvíce využívaným absorpčním koeficientem je poměr  $E_4/E_6$ , který je rovněž znám jako humifikační index. Tento absorpční koeficient je definován jako poměr absorbancí při vlnových délkách 465 a 665 nm. Chen a spol. [24] ve své práci ověřili, že hodnota humifikačního indexu klesá se střední molekulovou hmotností a stupněm kondenzace aromatického jádra HL. Rovněž ve své práci upozornili, že tento index je silně závislý na hodnotě pH roztoku, a proto doporučují měřit vodné roztoky při určitých hodnotách pH nejčastěji však při pH 7 a 9. HK izolované z kaustobiolitů mají hodnotu tohoto absorpčního koeficientu zpravidla v rozmezí 3–5. Bohužel v odborných týmech, které se zabývají studiem HK izolovaných z hnědého uhlí je rozpustná frakce organické hmoty zejména FK opomíjena, a to především díky náročnému postupu izolace těchto HL, a tudíž relevantní informace doposud v odborné literatuře chybí.

U některých vzorků organické hmoty je absorbance při 665 nm poměrně nízká, a proto byl navržen doplňkový absorpční koeficient  $E_2/E_4$ , který je definován jako poměr absorbancí při 265 a 465 nm.

Dalším absorpčním koeficientem, který byl navržen Pouravuořim a spol. [25] je absorpční koeficient  $E_2/E_3$ , který je definován jako poměr absorbancí při 250 a 365 nm. Tento absorpční index vypovídá nejen o molekulové hmotnosti a stupni aromaticity, jak je tomu u humifikačního indexu, ale signifikantně koreluje i s obsahem kyselých funkčních skupin ve struktuře HL.

Pro odhad polárních funkčních skupin ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$  a  $\text{C}=\text{O}$ ) ve struktuře HL a DOM byl Korshinem a spol. [26] navržen absorpční koeficient  $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$ , který je definován jako poměr absorbance tzv. pásu substituentů přenosu náboje (253 nm) a benzoidního pásu, který je definován v oblasti vlnových délek 203–230 nm. Vyšší obsah polárních funkčních skupin v supramolekule HL se projeví vyššími hodnotami tohoto koeficientu.

### 2.7.2 Infračervená spektrometrie HL

V dnešní době je měření HL a organické hmoty pomocí transmisní techniky (metoda KBr) na ústupu, a to především z důvodu prokazatelných změn ve struktuře HL během lisování tablety při velmi vysokém tlaku, kam zpravidla řadíme deprotonaci až dekarboxylaci vzorků HL. Vhodnější metodou studia HL je použití difuzní reflektance (DRIFT), při které nebyly ve FTIR spektrech pozorovány tyto změny ve struktuře HL [27; 28].

Gardea-Torresdey a spol. [29] ve své práci studovali sorpční vlastnosti modifikovaných HL. Huminové látky byly upraveny methylací a acetylací, čímž byly blokovány reaktivní skupiny, jako jsou karboxylové ( $-\text{COOH}$ ) a fenolické ( $-\text{OH}$ ). Na základě naměřených FTIR spekter nativních a modifikovaných HK bylo zjištěno, že absorpční pás lokalizovaný při  $1720\text{ cm}^{-1}$  odpovídající symetrické valenční vibraci  $\text{C}=\text{O}$  vazeb v karboxylových kyselinách se po zavedení methylových a acetylových funkčních skupin posunul k vyšším vlnovým číslům, tj.  $1740\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$ . Tyto absorpční pásy odpovídají valenční symetrické vibraci  $\text{C}=\text{O}$  vazeb v methyl- a acetyl-esterech. Rovněž byly lokalizovány absorpční pásy při  $1310\text{ cm}^{-1}$  a  $1255\text{ cm}^{-1}$ , které odpovídají  $\text{C}-\text{O}$  vibraci v aryl-esterech. Obdobných výsledků bylo dosaženo v práci Smilka a spol. [30], kteří studovali bariérové vlastnosti methylované a nativní HK s organickými barvivy pomocí difuzních experimentů.

### 2.7.3 TGA analýza HL

Termická analýza je vhodnou metodou pro studium stability rozličných druhů organické hmoty, ať už máme na mysli HL nebo snadno hydrolyzující organické látky půdní hmoty.

Tato termická technika se používá především ke stanovení obsahu vlhkosti a popele, tj. nespalitelného podílu ve vzorcích HL [31]. Rovněž je tato instrumentální technika využívána k predikci termické stability různých vzorků HL a DOM.

### 2.7.4 $^{13}\text{C}$ NMR spektrometrie HL

$^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie je v dnešní době nepostradatelnou metodou v oblasti strukturní analýzy HL.  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie v kapalně fázi (liquid state) se oproti NMR spektrometrii v pevné fázi vyznačuje především vyšší rozlišovací schopností, kdy nedochází ke slévání jednotlivých signálů do širokých absorpčních pásů [32].

$^{13}\text{C}$  NMR spektrum HL, respektive OM, je podle mnohých autorů rozděleno na čtyři oblasti, avšak Novák a spol. [32] rozdělili spektrum HL do šesti oblastí, které korespondují s jednotlivými konstitučními jednotkami v supramolekule těchto biokoloidních látek: oblast alifatických atomů uhlíku ( $0\text{--}45\text{ ppm}$ ), oblast substituovaných atomů uhlíku O-alkylových a peptidových ( $45\text{--}106\text{ ppm}$ ), oblast aromatických atomů uhlíku ( $106\text{--}145\text{ ppm}$ ), oblast fenolických atomů uhlíku ( $145\text{--}165\text{ ppm}$ ), oblast karboxylových atomů uhlíku ( $165\text{--}190\text{ ppm}$ ) a oblast karbonylových atomů uhlíku ( $190\text{--}210\text{ ppm}$ ).

Cenné informace o povaze HL lze získat z tzv. strukturních parametrů, které jsou definovány jako poměr intenzit signálů anebo jako plochy pod křivkou při vhodně zvolených chemických posunech ppm. Nejvýznamnějším strukturním parametrem v oblasti studia HL je index aromaticity  $f_a$ , který je definován jako poměr aromatických a fenolických atomů uhlíku ( $106\text{--}165\text{ ppm}$ ) ke všem ostatním atomům uhlíku vyjma karboxylových a karbonylových atomů ( $165\text{--}210\text{ ppm}$ ). Dalšími indexy, které jsou vhodné pro studium HL, jsou parametr biologické aktivity  $BiA$  a parametr odhadu hydrofobity HL  $H_{fi}/H_{fo}$  [32].

Novák a spol. [33] ve své práci použili  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrii k výpočtu a navržení hypotetické struktury lignohumátové kyseliny. Tento vzorek byl charakterizován následujícím strukturním vzorcem  $\text{C}_{205}\text{H}_{230}\text{N}_2\text{O}_{100}\text{S}_6$  se střední molekulovou hmotností  $4514,9\text{ Da}$ . Dále se podařilo určit hlavní stavební jednotky tohoto vzorku, které byly odvozeny od koniferyl

a sinapyl alkoholu. Bartle a spol. [34] se ve své práci zabývali stanovením střední molekulové hmotnosti nativních a methylovaných HK, které byly izolovány z rašeliny a dvou vzorků lignitu. Autorům se podařilo najít v  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech nativních a modifikovaných HK významné rozdíly, a to především v oblasti chemického posunu 0–106 ppm, kde došlo k absorpci alifatických a substituovaných atomů uhlíku i navzdory tomu, že HK zůstaly i po namethylování velmi konstitučně podobné.

Spaccini a spol. [35] se ve své práci věnovali stanovení bioaktivity HL izolovaných z kompostovaného ligno-celulosového odpadního materiálu produkovaného v bio-rafineriích. Pomocí nukleární magnetické resonance navrhli mechanismus a určité reakční dráhy mezi biologickou aktivitou HK a rostlinou. Rovněž dospěli k názoru, že taková recyklace biomasy se jeví jako vhodný přístup v oboru udržitelného zemědělství.

### 2.7.5 Fluorescenční spektrometrie HL

V dnešní době je fluorescenční spektrometrie stále hojně využívanou metodou v oblasti studia DOM respektive HL. *Steady-state* fluorescenční spektrometrie nám poskytuje cenné informace o struktuře, heterogenitě, přítomnosti rozličných substituentů na aromatickém jádře (–OH, –COOH, –O<sup>–</sup>, –OCH<sub>3</sub>, –OR, aj.), stupni humifikace a kondenzace aromatického jádra.

V excitačně-emisních fluorescenčních spektrech HL můžeme nalézt pět základních fluorescenčních maxim (typů fluoroforů), které jsou lokalizovány při určitých vlnových délkách excitace a emise.

Humínové látky izolované z terestriálních přírodních matric, zvláště z kaustobiolitů, jsou charakterizovány dvěma fluorescenčními maximy, které jsou v odborné literatuře označovány symboly *A* a *C* [36]. Fluorofor *A*, který je obvykle označován jako *fulvic-like*, je v excitačně-emisním spektru lokalizován v oblasti vlnových délek 240–280/400–500 nm ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ), zatímco fluorofor *C* (*humic-like*) se nachází v oblasti vyšších vlnových délek excitace tzn. při  $\lambda_{\text{ex}} \sim 300\text{--}380$  nm. V EEM spektrech HK izolovaných z kaustobiolitů lze pozorovat vedlejší fluorescenční maxima (tzv. *odvozené humic-like fluorofory*), které jsou lokalizovány v oblasti vyšších vlnových délek excitace a emise, tzn. 435–450/500–540 nm ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ). Tyto fluorofory jsou mnohými autory pokládány za typická maxima HK a FK izolovaných z rozličných přírodních matric. V případě vzorků HL izolovaných z pobřežních a mořských sedimentů lze v jejich EEM spektrech pozorovat specifické fluorescenční maximum *M*, které je obvykle lokalizováno v oblasti vlnových délek 290–310/370–410 nm. Tento fluorofor je v odborných pramenech označován jako *marine humic-like*.

V EEM spektrech jsou obvykle identifikovány i fluorofory nehumínového původu. Tyto fragmenty organické hmoty tvořící supramolekulu HL jsou produkovány na základě biologické aktivity mikroorganismů a vodní flóry. Jedná se především o doposud nehumifikovanou OM, která má svůj původ v látkách jako je tyrosin a tryptofan. Fluorofor *B* (*tyrosin-like*) je v EEM spektrech lokalizován v oblasti vlnových délek 270–280/300–315 nm, kdežto fluorescenční maximum *T* (*tryptofan-like*) se nachází v oblasti vyšších vlnových délek emise, tj. 345–360 nm.

Z dosavadních studií je zřejmé, že poloha jednotlivých fluorescenčních maxim huminového, ale i nehuminového (*protein-like*) charakteru je v příslušných EEM regionech neměnná. Případné odlišnosti v pozicích jsou zpravidla způsobeny přítomností elektron-akceptorních a elektron-donorních funkčních skupin, kterými jsou substituovány aromáty HL.

Doskočil a spol. [37] se ve své práci věnovali spektrální charakterizaci a porovnání huminových kyselin izolovaných ze sedmi vzorků lignitu ze šesti evropských uhelných pánví. Použitím metody excitačně-emisní fluorescence autoři pozorovali maxima v oblasti vlnových délek 255–265/460–510 nm. Tato maxima leží v oblasti označované symbolem *A* (*fulvic-like*), která podle autorů může souviset nejen se systémy aromatických kruhů, ale také s lipidy, jako jsou například steroidy. Autoři rovněž usoudili, že jednotlivá EEM spektra lignitových HK, izolovaných ze šesti evropských uhelných pánví, se mezi sebou významně neliší a jejich chemické vlastnosti jsou si podobné.

Sierra a spol. [38] ve své práci použili metodu excitačně-emisní fluorescence pro stanovení řady vzorků HK a FK izolovaných z různých prostředí. Autoři určili v použitých vzorcích HK a FK čtyři hlavní píky, které přiřadili fluoroforům *A*, *C*, *M* a *T*. U vzorků FK autoři lokalizovali fluorescenční maxima *A* (*fulvic-like*) a *C* (*humic-like*) při vlnových délkách 310/440 nm respektive 260/460 nm ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ). U vzorků HK byla maxima posunuta k vyšším vlnovým délkám, konkrétně byla lokalizována při 360/520 nm a 265/525 nm ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ). Fluorescenční maxima *A* a *C* byla přítomna u všech analyzovaných vzorků. Výskyt píků *M* (*marine humic-like*) a *T* (*tryptofan-like*) závisí podle autorů na původu OM a na stárnutí HK. Fluorescenční maximum *M* (*marine humic-like*) bylo lokalizováno při 320/430 nm ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ) a vyskytovalo se pouze u několika málo HK izolovaných z mořského prostředí. Naproti tomu maximum *T* (*tryptofan-like*), které autoři lokalizovali při vlnových délkách 275/315 nm pro FK a 275/330 nm ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ) pro HK, bylo lépe detekováno u vzorků FK. Toto maximum má typické fluorescenční vlastnosti podobné proteinům, zejména tryptofanu a je obtížně jej detekovat v HK a FK izolovaných z pozemních vzorků.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité metody a přístroje

- UV/Vis spektrometrie (Hitachi U3900H, Hitachi High Technologies America, Inc)
- elementární analýza (EA3000, CHNS-O elementární analyzátor EuroVector)
- termogravimetrická analýza (TGA Q5000 termogravimetrický analyzátor TA Instruments)
- FTIR spektrometrie (Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific, Inc)
- $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie (Bruker Avance III 500 MHz, Bruker Corporation)
- fluorescenční spektrometrie (FluoroLog®, Horiba Jobin Yvon Scientific, Inc)

### 3.2 Elementární analýza

Elementární složení vzorků HK (IHSS a mIHSS) bylo získáno pomocí CHNS-O elementárního analyzátoru EA3000. Elementární analyzátor byl kalibrován pomocí standardní látky *sulphanilamidu*. Navážené vzorky HK byly spáleny v atmosféře kyslíku při pracovní teplotě reaktoru 980 °C. Navážka vzorku HK do cínové kapsle činila ~ 1 mg. Oba vzorky studovaných HK byly naváženy celkem ve třech opakováních. Elementární složení HK bylo získáno pomocí vyhodnocovacího programu *Callidus*<sup>TM</sup>5.1.

### 3.3 TGA analýza

Vzorky nativní a methylované HK byly termogravimetricky analyzovány na TGA Q5000. Vzorky HK, jejichž navážka činila ~ 5 mg, byly spáleny z laboratorní teploty na konečnou teplotu 1000 °C v atmosféře vzduchu s průtokem 50 ml·min<sup>-1</sup> a s rychlostí ohřevu pece 10 °C·min<sup>-1</sup>. Ze získaných experimentálních dat byl následně určen obsah sorbované vlhkosti a nespalitelného podílu, tj. popela. Tyto hodnoty byly použity pro výpočet hmotnostního podílu kyslíku ve studovaných HK.

### 3.4 UV/Vis spektrometrie

UV/Vis spektrometrie byla v této práci použita k primární charakterizaci zkoumaných huminových kyselin. Pro tuto charakterizaci byly z naměřených spekter použity absorpční koeficienty  $E_2/E_4$ ,  $E_2/E_3$ ,  $E_4/E_6$  a  $E_{ET}/E_{BZ}$ , které byly získány poměrem absorbancí při vhodné zvolených vlnových délkách. Absorpční koeficient  $E_2/E_4$  byl získán z poměrů absorbancí při vlnových délkách 265 a 465 nm. Absorpční koeficient  $E_2/E_3$  je definován jako poměr absorbancí při 265 a 365 nm. Humifikační index  $E_4/E_6$ , který je v přímé spojitosti s koeficientem  $E_2/E_4$ , je definován, jako poměr absorbancí při vyšších vlnových délkách, tzn. při 465 a 665 nm. Absorpční koeficient  $E_{ET}/E_{BZ}$ , který je výrazně citlivý k obsahu polárních substituentů na aromatickém jádře HL, je určen poměrem absorbancí v UV oblasti absorpčního spektra při 253 a 220 nm.

#### 3.4.1 Příprava vzorků

V prvním kroku byly připraveny zásobní roztoky studovaných HK o hmotnostní koncentraci 100 mg·dm<sup>-3</sup> v 0,1 M roztoku NaOH a dimethylsulfoxidu (DMSO). Takto připravené roztoky byly použity za účelem studia HK pomocí tzv. humifikačního indexu, tzn.  $E_4/E_6$ . V tomto případě byla použita vyšší koncentrace HK a to z důvodu, jelikož obecně absorpční spektra



HL vykazují kvaziexponenciální průběh, kdy při nižších hmotnostních koncentracích by hodnoty absorpce ve VIS oblasti byly příliš nízké, a absorpční koeficient by byl zatížen významnou chybou. V případě absorpčních koeficientů  $E_2/E_4$ ,  $E_2/E_3$  a  $E_{ET}/E_{Bz}$  byly připraveny soly HK o hmotnostní koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . V případě vzorků HK rozpuštěných v DMSO se jednalo o přímé ředění zásobního roztoku příslušným rozpouštědlem. Naproti tomu, vzorky rozpuštěné v NaOH byly na požadovanou koncentraci ředěny pomocí standardního fosfátového pufru (směs  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  v objemovém poměru 0,61:0,39) o koncentraci  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-1}$  a hodnotě  $\text{pH} \sim 7$ .

### 3.4.2 Měření UV/Vis spekter

Takto připravené roztoky HK byly měřeny na UV/Vis spektrometru Hitachi U3900H. UV/Vis spektra HK byla naměřena v rozsahu vlnových délek 200–900 nm s krokem měření 1 nm a rychlostí skenu  $600 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Veškeré měření bylo realizováno v křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm. Použité vzorky HK byly připraveny a změřeny ve třech opakováních a následně byly z těchto spekter vypočteny příslušné absorpční koeficienty.

## 3.5 FTIR spektrometrie

Metoda infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) byla v této bakalářské práci použita zejména pro získání informací o struktuře a povaze HK, respektive pro stanovení obsahu jednotlivých funkčních skupin ve vzorcích HK. Pro získání FTIR spekter byla použita transmisní metoda (tj. lisování tablet HK v přítomnosti KBr) a metoda DRIFT (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*).

### 3.5.1 Příprava vzorků

#### 3.5.1.1 Transmisní technika

Vzorky pro měření FTIR spekter pomocí transmisní metody byly připraveny následujícím způsobem. V achátové třecí misce bylo rozetřeno 400 mg vyžíhaného KBr a následně bylo k tomuto množství přidáno 1–2 mg vzorku HK. Poté byla směs homogenizována a následně slisována na ručním laboratorním lisu do tenké tablety. Takto připravené vzorky tablet byly vloženy do nástavce FTIR spektrometru.

#### 3.5.1.2 Metoda DRIFT

Pro měření FTIR spekter pomocí DRIFT nástavce byly vzorky k měření připraveny podle následujícího postupu. V achátové třecí misce bylo rozetřeno 100 mg vyžíhaného KBr a k tomuto množství byly přidány 4 mg vzorku HK. Tato směs byla důkladně homogenizována a vzniklý vzorek byl vložen do nástavce difuzně-reflexní jednotky. Následně byla úpravou polohy vzorkovací pánvičky v DRIFT cele provedena optimalizace infračerveného záření dopadajícího na detektor spektrometru.

### 3.5.2 Měření FTIR spekter

Transmisní a DRIFT spektra byla měřena na FTIR spektrometru Nicolet iS50 v rozmezí vlnočtů  $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$  se spektrálním rozlišením  $4 \text{ cm}^{-1}$  a s počtem akumulovaných záznamů 512. Získaná DRIFT spektra byla převedena na jednotky *Kubelka-Munk*, které odpovídají jednotkám absorpce při transmisním měření, tzn. měření vzorku na průchod. Veškerá FTIR

spektra vzorků HK byla normalizována na hodnotu nejintenzivnějšího absorpčního pásu přítomného ve spektru.

### 3.6 $^{13}\text{C}$ NMR spektrometrie

Metoda spektrometrie nukleární magnetické rezonance isotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$  byla v této práci využita za účelem získání detailních informací o struktuře zkoumaných huminových kyselin.  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum bylo měřeno v kapalně fázi (liquid state) z důvodu vyšší rozlišovací schopnosti, kdy nedochází ke slévání jednotlivých signálů do širokých spekter [32].  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum bylo rozděleno na čtyři oblasti, jejichž signály byly integrovány: oblast alifatických atomů uhlíků (0–45 ppm), oblast substituovaných atomů uhlíku *O*-alkylových a peptidových (45–106 ppm), oblast aromatických a fenolických atomů uhlíku (106–165 ppm) a oblast karboxylových a karbonylových atomů uhlíku (165–210 ppm). Dále byl u obou vzorků HK stanoven index aromaticity  $f_a$ , jenž je definován jako poměr aromatických a fenolických atomů uhlíku (106–165 ppm) ke všem ostatním atomům uhlíku kromě karboxylových a karbonylových (165–220 ppm). V neposlední řadě byl vypočítán parametr biologické aktivity  $BiA$ , jenž je definován jako poměr obsahu biologicky účinných atomů uhlíku a karboxylových funkčních skupin (106–220 ppm) k biologicky inaktivním funkčním skupinám, tj. alifatickým a *O*-alkylovým (0–106 ppm).

#### 3.6.1 Příprava vzorků

Kapalné vzorky pro  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrii byly připraveny rozpuštěním 2 mg HK v 10 cm<sup>3</sup> roztoku DMSO (99,5% deuterovaný DMSO). U těchto vzorků již nebylo pH nikterak dále upravováno.

#### 3.6.2 Měření $^{13}\text{C}$ NMR spekter

$^{13}\text{C}$  NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance III 500 MHz (pracovní frekvence 125,77 MHz) na pracovišti Centrálních laboratoří Vysoké školy chemicko-technologické v Praze (prof. R. Hrabal). Pro potlačení nežádoucích deformací byla využita pulsní sekvence „ZRGPIG“. Šířka  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla nastavena na 31 250 Hz, délka 90° pulsu na 10,5 μs, akviziční čas byl 0,52 s, relaxační doba mezi jednotlivými skeny činila 2,0 s a počet skenů byl nastaven na 25 000.

### 3.7 Ustálená fluorescenční spektrometrie

Stacionární fluorescenční spektrometrie (*steady-state*) byla v této bakalářské práci použita pro získání detailních informací týkajících se struktury, heterogenity, přítomnosti elektron-donorních (–OH, –NH<sub>2</sub>, –O<sup>–</sup>, –CN, –OCH<sub>3</sub> a –OR) a elektron akceptorních (–COOH a –NO<sub>2</sub>) funkčních skupin, stupně humifikace a kondenzace aromatických struktur. HK byly v této práci charakterizovány pomocí jejich excitačně-emisních fluorescenčních spekter (EEM), ze kterých byly odečteny polohy jednotlivých fluorescenčních maxim, tzn. typů fluoroforů. Jednotlivé typy fluorescenčních maxim jsou podrobně diskutovány v kapitole 2.7.5.

#### 3.7.1 Příprava vzorků

Za účelem studia použitých HK pomocí ustálené fluorescenční spektrometrie byly připraveny jejich roztoky o hmotnostní koncentraci 10 mg·dm<sup>–3</sup> ve standardním fosfátovém pufru

o koncentraci  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a hodnotě  $\text{pH} \sim 7$ . Rovněž byly připraveny roztoky HK o koncentraci  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-1}$  v DMSO.

### 3.7.2 Měření fluorescenčních spekter

Měření bylo realizováno na *steady-state* fluorescenčním spektrometru Horiba FluoroLog®, s nastavenou šířkou štěrbin excitačního a emisního monochromátoru 5 nm v křemenné kyvetě pro fluorescenční spektrometrii s optickou dráhou 1 cm. Excitačně-emisní fluorescenční spektra (EEM – *Excitation-Emission Matrix*) solí HK byla změřena v rozsahu vlnových délek emisní osy 300–600 nm a v rozsahu vlnových délek excitační osy 260–280 nm. EEM spektra byla změřena při shodném kroku excitačního a emisního monochromátoru, tj. 5 nm. V EEM spektrech roztoků HL můžeme obecně pozorovat Rayleighův a Ramanův rozptyl světla. Tyto rozptylové efekty byly potlačeny odečtením EEM spektra čistého rozpouštědla, tzn. 0,1 M NaOH a DMSO od naměřených spekter HK. Z naměřených experimentálních dat byly po korekci vnitřního filtračního efektu (IFE – *Inner Filter Effect*) vytvořeny matice, ze kterých byly následně vymodelovány EEM spektra vzorků HK pomocí vyhodnocovacího programu OriginPro 8.1.

## 4 DISKUZE A VÝSLEDKY

### 4.1 Elementární analýza

Naměřené výsledky elementárního složení nativní a methylované HK a jejich atomové poměry H/C, O/C a N/C jsou uvedeny v Tabulce 1. Z výsledků elementární analýzy je patrné, že použité vzorky HK jsou tvořeny převážně uhlíkem, vodíkem a kyslíkem. Dusík je u obou HK zastoupen v minoritním množství. Atomová procenta jsou pro jednotlivé zastoupení biogenních prvků v HK použita z toho důvodu, že hmotnostní procenta nevystihují přesné elementární složení těchto *biokoloidních* látek, a to z důvodu silného podhodnocení obsahu vodíku. Z výsledků elementárního složení studovaných huminových kyselin je zřejmé, že HK obsahují přibližně stejné množství dusíku a kyslíku. Naproti tomu lze pozorovat jisté odlišnosti v obsahu uhlíku a vodíku. Methylovaná HK byla charakterizována vyšším obsahem vodíku a nižším obsahem uhlíku v porovnání s nativní HK. Naproti tomu se předpokládalo, že tato HK bude tvořena i vyšším obsahem organického uhlíku, a to proto, že při methylaci je vodík na karboxylové skupině nahrazen methylovou funkční skupinou. Jak již bylo diskutováno dříve, tak tento nesoulad je pravděpodobně způsoben ztrátou některých aromatických frakcí při purifikaci mIHSS [39].

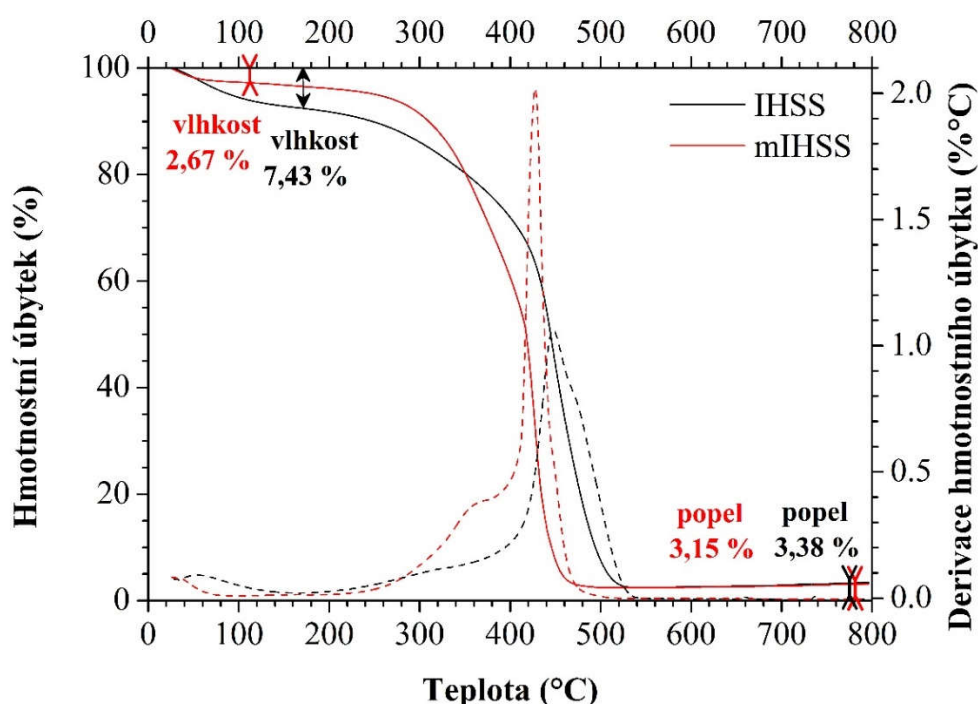
Tabulka 1 *Elementární složení použitých HK (elementární složení vzorků HK jsou uvedena v atom. %) a jejich vypočtené atomové poměry H/C, O/C a N/C*

vzorek HK	elementární složení v atom. %				H/C	O/C	N/C
	C	H	N	O			
Leonardite	43,46	38,19	0,36	18,00	0,88	0,41	0,01
m-Leonardite	42,89	39,04	0,37	17,70	0,91	0,41	0,01

V širším pohledu na prezentované výsledky atomových poměrů HK můžeme říci, že studované HK jsou charakterizovány stejnými hodnotami atomových poměrů O/C a N/C. Tyto výsledky vypovídají, že během methylace HK nedochází ke strukturním změnám z hlediska obsahu funkčních skupin a strukturních jednotek, které obsahují kyslík a dusík. Jako cenný indikátor methylace HK se ukázal atomový poměr H/C, který v sobě odráží míru (de)hydrogenace HL. V případě vzorku mIHSS byl tento poměr vyšší, a proto se můžeme domnívat, že vzorek nativní HK je charakterizován vyšším stupněm aromaticity a nižším stupněm hydrogenace. Vyšší hodnota tohoto atomového poměru v případě methylované HK svědčí o zapojení methylových skupin prostřednictvím esterové vazby v karboxylových skupinách [39].

## 4.2 TGA analýza

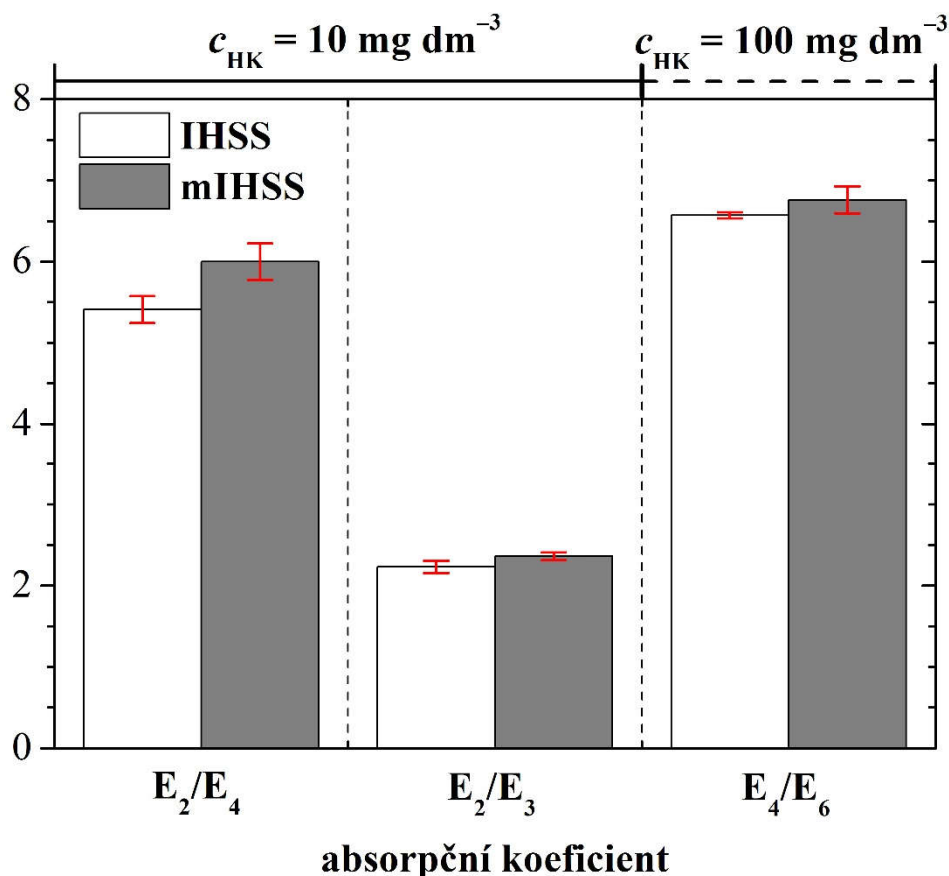
Na Obrázku 7 jsou uvedeny TGA a DTG křivky studovaných vzorků HK. Jak je patrné z výsledků uvedených na Obrázku 7, vlhkost použitých vzorků se pohybovala v rozmezí 2,7–7,4 hm. %. Tato vlhkost je převážně způsobena sorbovanou vzdušnou vlhkostí prostřednictvím kyselých funkčních skupin jako jsou karboxylové ( $-\text{COOH}$ ) a fenolické skupiny ( $-\text{OH}$ ). Pomocí TGA analýzy bylo zjištěno, že vzorek methylované HK obsahoval přibližně 2,5 krát méně sorbované vlhkosti. To je způsobeno blokadou kyselých funkčních skupin methylovými skupinami, které nevytvářejí vodíkové můstky a nedochází tak k sorpci molekul vody na povrchu mIHSS. Z porovnání HK z hlediska obsahu nespalitelného podílu, tj. popele, je zřejmé, že vzorky vykazovaly podobnou čistotu, jejíž popel byl stanoven v rozmezí 3,2–3,4 hm. %. Tyto hodnoty vypovídají o relativně vysoké čistotě použitých HK. Výsledný obsah nespalitelného podílu v HK je dán purifikačními kroky při izolaci HK, kam zpravidla řadíme dekalifikaci přírodní matrice, ze které jsou HL izolovány a čištění HL pomocí směsi roztoků kyseliny chlorovodíkové a fluorovodíkové.



Obrázek 7 TGA analýza nativní a methylované HK

### 4.3 UV/Vis spektrometrie

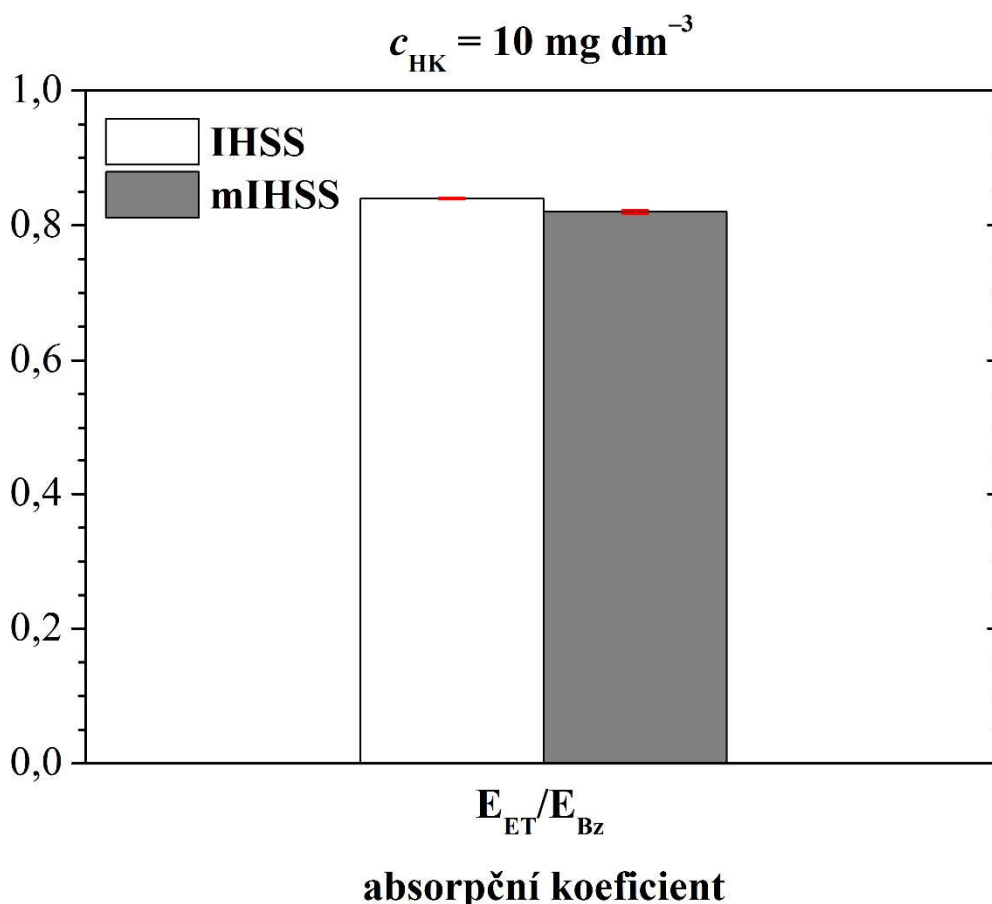
Hodnoty vypočtených absorpčních koeficientů  $E_2/E_4$ ,  $E_2/E_3$  a  $E_4/E_6$  pro oba vzorky huminových kyselin byly vyneseny do sloupcového grafu (Obrázek 8). Podobným způsobem byly zpracovány hodnoty absorpčních koeficientů  $E_{ET}/E_{BZ}$ , které lze rovněž vidět v podobě sloupcového grafu na Obrázku 9. Výsledné hodnoty absorpčních koeficientů představují průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Vypočtené směrodatné odchylky jednotlivých absorpčních koeficientů jsou ve zmíněných grafech znázorněny v podobě chybových úseček.



Obrázek 8 Absorpční koeficienty pro vzorky HK v DMSO

Jak můžeme vidět na Obrázku 8, tak hodnoty absorpčních koeficientů  $E_4/E_6$  (tj. humifikační index) a  $E_2/E_4$  jsou pro metylovanou HK v DMSO vyšší než hodnoty koeficientů u nativní HK. Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.7.1, hodnota humifikačního indexu  $E_4/E_6$  klesá se střední molekulovou hmotností a stupněm kondenzace aromatického jádra HL [24]. Z uvedeného grafu lze tedy usuzovat, že metylovaná HK obsahuje v porovnání s nativní HK vyšší obsah alifatických jednotek, tzn. methylových funkčních skupin, které jsou v této HK přítomny v podobě alkyl-esterů zejména však aryl-esterů HK. Z vypočtených absorpčních koeficientů uvedených v Obrázku 8 je zřejmé, že nejvíce citlivým absorpčním koeficientem pro predikci alifatických strukturních jednotek v HL je koeficient  $E_2/E_4$  [40]. Mimo jiné si můžeme povšimnout, že rozdíly v jednotlivých hodnotách použitých absorpčních koeficientů jsou mezi studovanými HK poměrně výrazné, a proto se můžeme domnívat, že obsah aromatických strukturních jednotek, kondenzace aromatického jádra

a střední molekulová hmotnost jsou během methylace HK změněny. I když někteří autoři ve svých pracích tvrdí [41] že během methylace či acetylace HL nedochází ke strukturním změnám, je z našich výsledků zřejmé, že jistá část aromatické frakce HK je během methylace ztracena. Toto tvrzení je v dobré shodě s výsledky  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie. Z vypočtených hodnot absorpčních koeficientů je patrné, že jednotlivé absorpční koeficienty spolu koreluji a tudíž jsou dobrými ukazateli chemických změn ve struktuře HL.



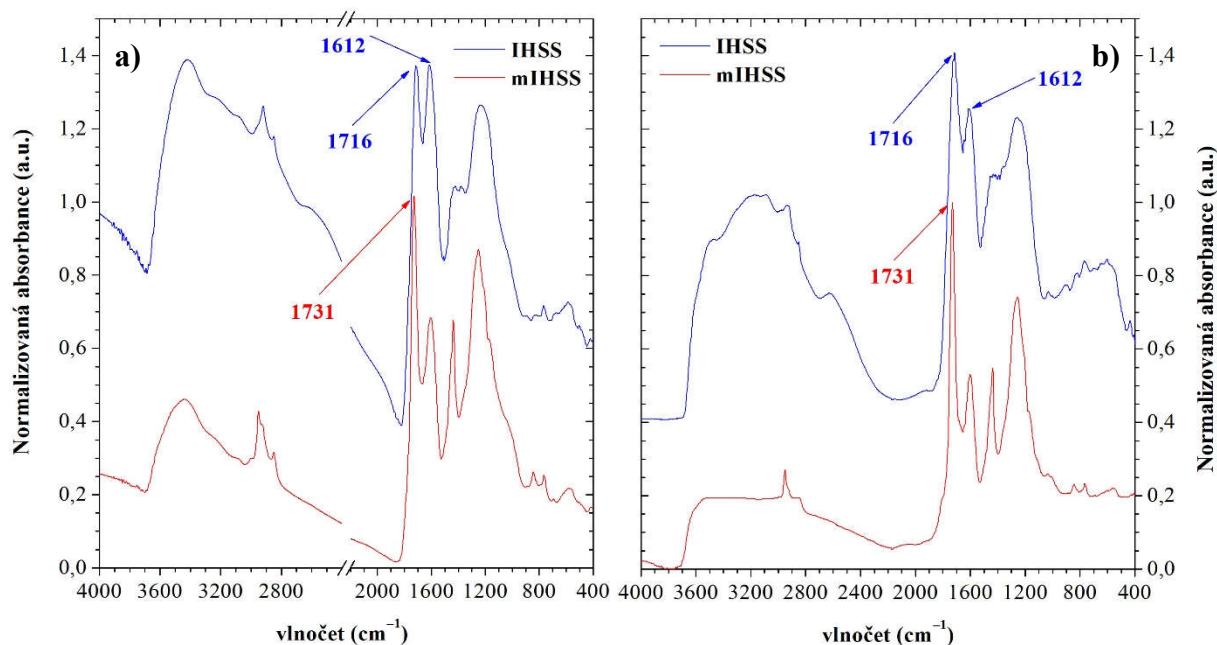
Obrázek 9 Absorpční koeficienty  $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$  pro vzorky HK ve fosfátovém pufru ( $\text{pH} \sim 7$ )

Na Obrázku 9 jsou prezentovány vypočtené absorpční koeficienty  $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$  pro nativní a methylovanou HK. Jak již bylo zmíněno dříve, tento absorpční koeficient je silně citlivý k substituentům na aromatickém jádře, které ve svých strukturách obsahují kyslík. Tento absorpční koeficient byl použit k predikci stability methylesteru HK v prostředí zředěného roztoku NaOH. Obecně platí, že v alkalickém prostředí dochází k de-esterifikaci organických látek za vzniku soli příslušné kyseliny a alifatického alkoholu, který odpovídá navázané funkční skupině při esterifikaci (methylaci). Z vypočtených absorpčních koeficientů  $E_{\text{ET}}/E_{\text{Bz}}$  je zřejmé, že vzorek mIHSS je v alkalickém prostředí podroben hydrolyze, kdy dochází k de-esterifikaci (de-methylaci) použité mIHSS a to z důvodu velmi blízkých hodnot tohoto koeficientu získaného pro nativní a methylovanou HK. Tento dílčí závěr je rovněž potvrzen výsledky, které byly získány pomocí stacionární fluorescenční spektrometrie. Z tohoto důvodu byly ostatní absorpční koeficienty získány měřením vzorků HK, které byly rozpuštěny v DMSO.

#### 4.4 FTIR spektrometrie

Na Obrázku 10a jsou zobrazena FTIR spektra standardů HK *Leonardite* a *m-Leonardite* získaná transmisí metodou. Široký absorpční pás, lokalizovaný v oblasti  $\approx 3500\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$  se specifickým pásem při  $3424\text{ cm}^{-1}$  pro nativní HK a při  $3440\text{ cm}^{-1}$  pro methylovanou HK, je připisován valenčním vibracím O–H vazeb v karboxylových kyselinách, alkoholech, aj. strukturních jednotek obsahující –OH skupinu. Dále je v FTIR spektru lokalizován méně výrazný absorpční pás v oblasti  $3100\text{--}3040\text{ cm}^{-1}$ , se specifickým pásem při  $3085\text{ cm}^{-1}$  pro nativní HK a při  $3093\text{ cm}^{-1}$  pro methylovanou HK, jenž je připisován valenční symetrické vibraci C–H vazeb v aromatických jednotkách. V případě obou HK byly dále identifikovány velmi výrazné absorpční pásy v oblastech  $2915\text{ cm}^{-1}$  a  $2850\text{ cm}^{-1}$  pro nativní HK a v oblastech  $2950\text{ cm}^{-1}$  a  $2854\text{ cm}^{-1}$  pro methylovanou HK. Tyto absorpční pásy jsou tradičně přisuzovány asymetrickým a symetrickým valenčním vibracím C–H vazeb v methylenových skupinách. V případě nativní HK si můžeme dále všimnout širokého absorpčního pásu v oblasti  $2700\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$  se specifickým pásem při  $2623\text{ cm}^{-1}$ , který je obvykle připisován valenční symetrické vibraci O–H $\cdots$ O vazeb v karboxylových kyselinách, které jsou vázané vodíkovými vazbami. Jak lze vidět, u methylované HK tento absorpční pás chybí, což je způsobeno s největší pravděpodobností methylací a tedy tvorbou methylesteru –O–CH<sub>3</sub> v karboxylových funkčních skupinách. Hlavní absorpční pásy jednotlivých funkčních skupin byly pozorovány v oblasti vlnočtů  $1800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ . U nativní HK můžeme pozorovat velmi intenzivní absorpční pás při  $1716\text{ cm}^{-1}$ . V případě mIHSS je tento pás lokalizován v oblasti vyšších vlnočtů, tzn.  $1731\text{ cm}^{-1}$ . Absorpční pás lokalizovaný při  $1716\text{ cm}^{-1}$  odpovídá symetrické valenční vibraci C=O vazeb v karboxylových kyselinách naproti tomu, pás lokalizovaný při vyšších vlnočtech odpovídá specifické absorpci C=O vazeb v aryl-esterech. Z porovnání FTIR spekter, získaných transmisí a DRIFT metodou, je zřejmé, že během lisování tablet dochází k de-protonaci případně i k dekarboxylaci či de-esterifikaci studovaných HK. Tento nežádoucí jev je zvláště patrný na intenzitě absorpčních pásů, které odpovídají karboxylovým a esterovým funkčním skupinám. Z tohoto důvodu je vhodnější při měření FTIR spekter HL použít DRIFT metodu. Rovněž si ve spektrech HK nelze nepovšimnout ostrého a poměrně intenzivního absorpčního pásu, který byl lokalizován při  $1612\text{ cm}^{-1}$ . Tento absorpční pás je výhradně připisován valenční symetrické vibraci C=C vazeb v aromátech. Mimo jiné je na tomto místě nutné říci, že tento absorpční pás byl použit k predikci změn v intenzitě absorpčních pásů odpovídajících esterům a karboxylovým kyselinám, a to z důvodu, že tento absorpční pás není nikterak ovlivněn při lisování KBr tablety. Dále si můžeme u nativní HK povšimnout malého absorpčního pásu v oblasti  $1512\text{--}1508\text{ cm}^{-1}$ , který je rovněž přisuzován valenčním vibracím C=C vazeb v aromátech. Absorpční pás lokalizovaný při  $1423\text{ cm}^{-1}$  může být přiřazen k deformačním vibracím C–H vazeb v methylenových a methylových funkčních skupinách. Absorpční pás lokalizovaný při  $1380\text{ cm}^{-1}$  je výhradně připisován deformační symetrické vibraci C–H vazeb v methylových funkčních skupinách. Tento absorpční pás je v případě vzorku mIHSS překryt silnou absorpcí pásu lokalizovaného při  $1438\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá asymetrické deformační vibraci C–H vazeb v methylových skupinách. Ve FTIR spektrech vzorku nativní HK byl lokalizován poměrně intenzivní a ostrý absorpční pás při  $1238\text{ cm}^{-1}$ , který je zpravidla připisován symetrické vibraci C–O vazeb v –COOH skupinách. Naproti tomu byl tento absorpční pás

v případě vzorku mIHSS posunut k vyšším vlnovým číslům a svědčí o specifické absorpci C–O vazeb v methylesterech karboxylových kyselin. Mimo jiné si ve FTIR spektrech vzorku mIHSS můžeme povšimnout intenzivního raménka při  $1170\text{ cm}^{-1}$ , které odpovídá vazebné vibraci C–C–O vazeb v aryl-esterech. Ve všech FTIR spektrech HK byl lokalizován méně intenzivní absorpční pás při  $1040\text{ cm}^{-1}$ , který je zpravidla připisován valenční symetrické vibraci Si–O vazeb v silikátech. Tato hypotéza je rovněž podpořena zbytkovým popelem, který byl stanoven pomocí TGA analýzy. Ve FTIR spektrech lze pozorovat triplet absorpčních pásů, které byly lokalizovány v oblastech vlnových čísel  $894\text{--}875\text{ cm}^{-1}$ ,  $844\text{--}825\text{ cm}^{-1}$  a  $771\text{--}759\text{ cm}^{-1}$ . První zmíněný absorpční pás, který byl lokalizován při  $894\text{--}875\text{ cm}^{-1}$ , je zpravidla připisován deformační vibraci C–H vazeb v *meta*-substituovaných aromatických sloučeninách, které mají svůj původ v látkách jako je koniferylalkohol a sinapylalkohol. Absorpční pás, který se nachází v oblasti vlnových čísel  $844\text{--}825\text{ cm}^{-1}$  je rovněž připisován deformační vibraci C–H vazeb, avšak v *para*-substituovaných aromatických sloučeninách, jejichž strukturní jednotky mohou být odvozené např. od 4-hydroxycannamylalkoholu. Poslední absorpční pás ze zmíněného tripletu absorpčních pásů se nachází v oblasti vlnových čísel  $771\text{--}759\text{ cm}^{-1}$  a je připisován deformační vibraci C–H vazeb v *ortho*-substituovaných aromatických sloučeninách. Jak můžeme vidět na Obrázku 10, nejintenzivnější signál byl u nativní HK (IHSS) identifikován v absorpčním pásu  $771\text{--}759\text{ cm}^{-1}$ , zatímco u methylované HK to byl pás v oblasti  $844\text{--}825\text{ cm}^{-1}$ . Tyto změny jsou pravděpodobně způsobeny methylací HK, kdy je z těchto výsledků zřejmé, že karboxylové skupiny jsou methylovány zvláště v para poloze. Identifikace jednotlivých absorpčních pásů byla provedena za použití odborné literatury [33; 42; 43; 44; 45].



Obrázek 10 **a)** normalizovaná transmisní FTIR spektra standardů HK Leonardite a *m*-Leonardite; **b)** jejich FTIR-DRIFT spektra

Pomocí FTIR spektrometrie studovaných HK bylo dokázáno, že při použití transmisní techniky dochází při lisování KBr tablety se vzorkem k de-protonaci, resp. dekarboxylaci nativní HK a rovněž k de-esterifikaci methylované HK. Jako vhodná FTIR technika se pro



studium HK ukázala metoda DRIFT, kdy tyto nežádoucí jevy byly eliminovány. Rovněž bylo dokázáno, že infračervená spektrometrie je vhodnou analytickou technikou v oblasti studia strukturních změn HL, kdy můžeme ve FTIR spektrech pozorovat rozličné absorpční pásy, které připadají různým funkčním skupinám či strukturním jednotkám.

#### 4.5 $^{13}\text{C}$ NMR spektrometrie

Vypočtené strukturní parametry  $f_a$ ,  $BiA$  a hodnoty procentuálního zastoupení uhlíkových atomů v jednotlivých integrálních oblastech jsou prezentovány v Tabulce 2.

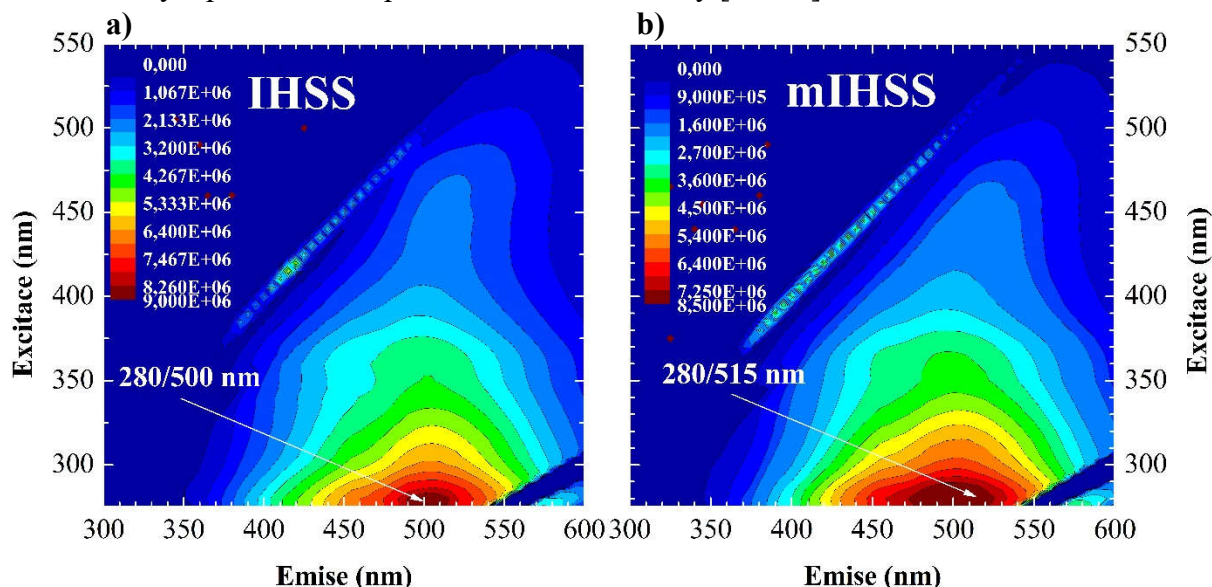
Tabulka 2 Stanovené procentuální zastoupení uhlíkových atomů v příslušných integrálních oblastech a vypočtené strukturní parametry aromaticity ( $f_a$ ) a biologické aktivity ( $BiA$ )

vzorek HK	zastoupení ve spektrální oblasti (%)				$f_a$ (–)	$BiA$ (–)
	0–45	45–106	106–165	165–220		
	ppm	ppm	ppm	ppm		
Leonardite	16,0	7,0	59,0	18,0	0,72	3,35
m-Leonardite	11,0	18,0	53,0	18,0	0,65	2,45

Jak je zřejmé z výsledků uvedených v Tabulce 2, analyzované vzorky vykazují typické hodnoty procentuálního zastoupení uhlíkových atomů a strukturních parametrů  $f_a$  a  $BiA$  pro huminové kyseliny izolované z *Leonarditu* [46]. Z experimentálních dat uvedených v Tabulce 2 je zřejmé, že vzorek nativní HK byl charakterizován vyšším obsahem alifatických a aromatických atomů uhlíku. Toto zjištění se zdá být na první pohled v rozporu s výše uvedenými výsledky, avšak musíme mít na paměti, že signál methylesterů se projeví zvýšením obsahu O-alkylových atomů uhlíku, jejichž specifická absorpce nastává v oblasti 45–106 ppm. Jinými slovy, methylace se neprojeví zvýšením signálu v oblasti alifatických atomů uhlíku s hybridizací  $sp^3$ , ale v oblasti 45–106 ppm. Rovněž si v Tabulce 2 můžeme povšimnout, že vzorek methylované HK byl charakterizován nižším obsahem aromatických struktur. To může být způsobeno tím, že při methylaci HK dochází při purifikačních procedurách k vymytí, resp. ztrátě některé z aromatických frakcí HK. Naproti tomu obsah karboxylových a karbonylových atomů uhlíku zůstal po methylaci HK stejný, a můžeme se tedy domnívat, že zvolený postup methylace HK nikterak neovlivňuje obsah těchto funkčních skupin. Z vypočtených hodnot aromaticity  $f_a$  je zřejmé, že nativní HK se vyznačovala vyšším stupněm aromaticity. Tento výsledek rovněž potvrzuje, že vzorek mIHSS byl v průběhu methylace úspěšně namethylován. Rovněž si můžeme povšimnout, že po methylaci HK došlo významně ke snížení koeficientu biologické aktivity, a to z důvodu blokace reaktivních funkčních skupin (–COOH a –OH) methylovou funkční skupinou. Z toho vyplývá, že takto modifikovaná HK je méně reaktivní a není schopna interagovat s rozličnými látkami, ať už máme na mysli výživové prvky (např. rostlinné nutrienty) či polutanty [32; 34]. Tyto výsledky jsou v dobré shodě se závěry získanými pomocí ostatních instrumentálních technik, které byly v této bakalářské práci použity, a to zejména s FTIR spektrometrií a fluorescenční spektrometrií v ustáleném stavu.

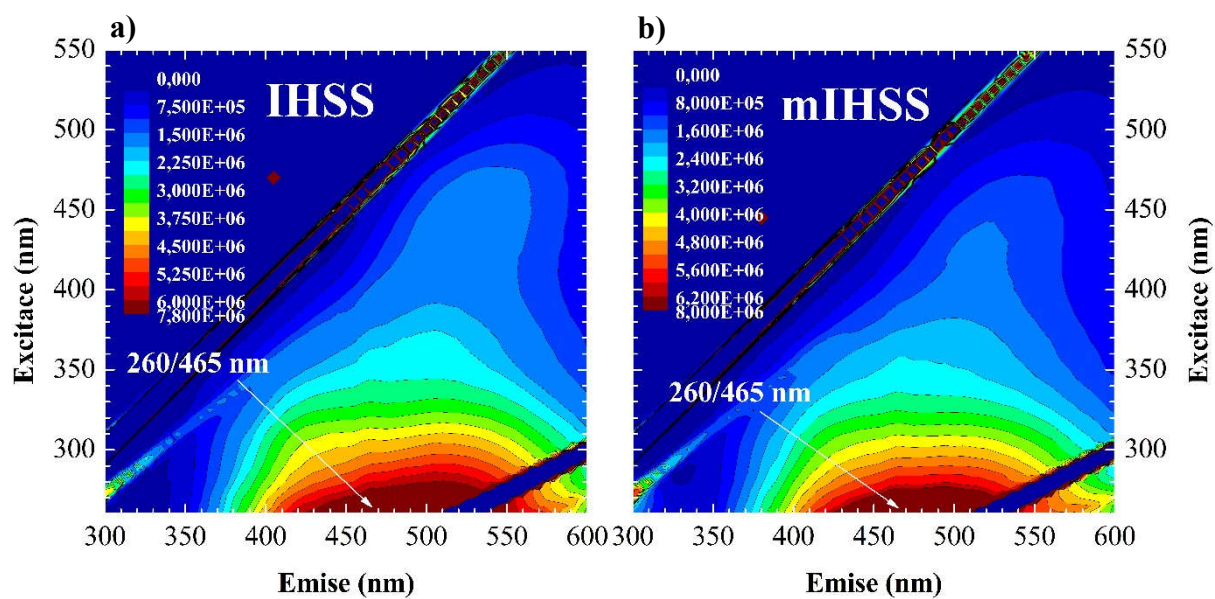
## 4.6 Ustálená fluorescenční spektrometrie

Na Obrázku 11 jsou uvedena excitačně-emisní fluorescenční spektra EEM standardu nativní HK a její methylované formy mHK. V EEM spektru nativní HK (Obrázek 11a) bylo lokalizováno fluorescenční maximum v oblasti vlnových délek 280/500 nm ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ), které je tradičně připisováno fluoroforu *A* (*fulvic-like*). Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.7.5, fluorofor *A* patří podle mnoha autorů mezi typická maxima HL izolovaných z různých přírodních matric, kam zpravidla řadíme kaustobiolity, půdní matrice, sedimenty a určité sladkovodní zdroje jako jsou řeky a jezera. U methylované HK (Obrázek 11b) se toto maximum nachází při vyšších vlnových délkách emise a při stejné hodnotě excitační vlnové délky, konkrétně 280/515 nm. Z porovnání poloh fluorescenčního maxima *A* (*fulvic-like*) je zřejmé, že standard IHSS byl po methylaci silně substituován elektron-donorními funkčními skupinami, kam zpravidla řadíme alkyl- a aryl-estery. Rovněž si můžeme povšimnout, že oba vzorky HK byly charakterizovány rozdílnými intenzitami fluorescence  $I_F$ . V tomto případě se však nejedná o rozdílnou molekulární heterogenitu studovaných HK, nýbrž je odrazem rozdílných koncentrací daného vzorku v roztoku. Interpretace EEM spekter a přítomných fluoroforů byla provedena za použití odborné literatury [36; 37].



Obrázek 11 Excitačně-emisní spektra HK v DMSO **a)** standard HK Leonardite **b)** standard HK m-Leonardite

Na Obrázku 12 jsou uvedena EEM spektra nativní a modifikované HK, která byla měřena ve standardním fosfátovém pufru při hodnotě pH  $\sim 7$ . Tyto vzorky byly připraveny ze zásobního roztoku HK, která byla rozpuštěna ve zředěném roztoku NaOH (viz. kapitola 3.4.1). V obou EEM spektrech vzorků HK bylo lokalizováno fluorescenční maximum v oblasti vlnových délek 260/465 nm. Toto zjištění je rovněž potvrzením, že při rozpouštění methylované HK dochází k hydrolýze, a tedy k de-esterifikaci vzorku mIHSS. Mimo jiné si můžeme povšimnout, že fluorescenční maximum *A* bylo v případě fosfátového pufru lokalizováno v oblasti nižších vlnových délek excitace a emise. Tento pohyb fluoroforu *A* je způsoben použitým druhem rozpouštědla, které ovlivňuje de-excitační jevy před vyzařením emisního záření (tzv. relaxace rozpouštědla).



Obrázek 12 Excitačně-emisní spektra HK v pufru ( $pH=7$ ) **a)** standard HK Leonardite **b)** standard HK *m*-Leonardite

## 5 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na charakterizaci nativní a methylované huminové kyseliny pomocí termických a spektrometrických metod. Cílem práce bylo nalézt rozdíly ve struktuře a ověřit vhodnost použitých technik k charakterizaci těchto biokoloidních látek. Vzorky huminových kyselin byly charakterizovány pomocí termogravimetrické analýzy (TGA), elementární analýzy (EA), molekulové absorpční spektrometrie (UV/Vis), infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR), fluorescenční spektrometrie a v neposlední řadě i pomocí nukleární magnetické rezonance ( $^{13}\text{C}$  NMR).

Výsledky elementární analýzy potvrdily, že HK jsou složeny převážně z uhlíku, vodíku, kyslíku a v minoritním množství i z dusíku. Při porovnání obou vzorků HK lze konstatovat, že obě HK obsahují stejné množství kyslíku a dusíku. V porovnání s nativní HK byla methylovaná HK charakterizována vyšším obsahem vodíku a nižším obsahem uhlíku, což není v souladu s předpokladem, podle kterého měla methylovaná HK obsahovat i větší množství uhlíku. Tento nesoulad byl pravděpodobně způsoben ztrátou některých aromatických frakcí při purifikaci mIHSS. Pomocí atomových poměrů bylo dále potvrzeno, že vzorek nativní HK je charakterizován vyšším stupněm aromaticity a nižším stupněm hydrogenace. V neposlední řadě byla pomocí poměru H/C prokázána přítomnost methylových skupin, které jsou vázány prostřednictvím esterových vazeb na karboxylových funkčních skupinách.

Podle výsledků TGA analýzy bylo zjištěno, že vzorek methylované HK obsahoval méně sorbované vlhkosti, než vzorek nativní HK. Důvodem je blokáce kyselých funkčních skupin methylovými skupinami, které nevytvářejí vodíkové můstky a zabraňují tak sorpci molekul vody na povrchu methylované HK. Podle naměřených hodnot obsahu popela byla poté stanovena vysoká čistota obou zkoumaných HK.

Použitím absorpčních koeficientů v UV/Vis spektrometrii byly zjištěny značné rozdíly ve strukturách zkoumaných vzorků. Methylovaná HK obsahuje v porovnání s nativní HK vyšší obsah alifatických jednotek, které jsou v této HK přítomny v podobě alkyl-esterů, zejména však aryl-esterů HK. Dále je z výsledků zřejmé, že během procesu methylace HK došlo ke změnám ve struktuře HK a jistá část aromatické frakce byla během tohoto procesu ztracena. Toto tvrzení je v dobré shodě s výsledky  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie. V neposlední řadě bylo zjištěno, že u vzorku methylované HK v alkalickém prostředí zředěného roztoku NaOH dochází k de-esterifikaci (de-methylaci), a proto je vhodnější použít jako rozpouštědlo DMSO.

FTIR spektrometrie ukázala typická spektra HK, která jsou publikována mnoha autory. V naměřených spektrech methylované HK byly rovněž vidět absorpční pásy, jež odpovídají přítomnosti esterových  $-\text{CH}_3$  skupin. Pro získání FTIR spekter byla použita transmisní metoda a metoda difuzního odrazu DRIFT. Bylo dokázáno, že u transmisní techniky dochází při lisování KBr tablety k de-protonaci, dekarboxylaci a také k de-esterifikaci methylované HK. Jako vhodná FTIR technika se pro studium HK ukázala metoda DRIFT, pomocí které byly tyto nežádoucí jevy eliminovány.

Podle výsledků  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie byl vzorek methylované HK charakterizován nižším obsahem aromatických struktur, než vzorek nativní HK. To mohlo být způsobeno tím, že při methylaci HK dochází při purifikačních procedurách k vymytí, resp. ztrátě některé z aromatických frakcí HK. Dále bylo pomocí  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie zjištěno, že zvolený postup methylace HK nikterak neovlivňuje obsah karboxylových a karbonylových funkčních skupin. V neposlední řadě byly stanoveny parametry  $f_a$  a  $BiA$ , jejichž hodnoty byly vyšší pro nativní HK. Z vypočtených hodnot  $f_a$  byla nativní HK charakterizována vyšším stupněm aromaticity, což dokazuje, že vzorek mIHSS byl v průběhu methylace úspěšně namethylován. Koeficient biologické aktivity byl u methylované HK nižší z důvodu blokace reaktivních funkčních skupin ( $-\text{COOH}$  a  $-\text{OH}$ ) methylovou funkční skupinou. Z toho vyplývá nízká schopnost methylované HK reagovat s rozličnými látkami jako jsou polutanty či výživové prvky.

Při měření fluorescenčních spekter (EEM) bylo u obou vzorků HK, rozpuštěných v DMSO, lokalizováno maximum odpovídající fluoroforu *A*. Na základě odlišných emisních vlnových délek obou vzorků HK bylo zjištěno, že vzorek methylované HK byl po methylaci silně substituován elektron-donorními funkčními skupinami, zejména alkyl- a aryl-estery. U měření EEM spekter ve standardním fosfátovém pufru bylo také dokázáno, že při rozpouštění methylované HK dochází k hydrolýze, a tedy k de-esterifikaci vzorku mIHSS. Tento použitý druh rozpouštědla také ovlivňuje de-excitační jevy před vyzářením emisního záření (tzv. relaxace rozpouštědla). Z toho důvodu je vhodnější na fluorescenční spektrometrii HK použít jako rozpouštědlo DMSO.

## 6 LITERATURA

- [1] O huminových látkách. *INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY (IHSS)* [online]. 2018 [cit. 2018-12-18]. Dostupné z: <http://www.ihss-cz.cz/o-huminovych-latkach.html>
- [2] STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. New York: Wiley, 1994. ISBN 978-0-471-59474-1.
- [3] Leonardite. *JISA, JILOCA INDUSTRIAL, S.A.* [online]. Valencia, 2019 [cit. 2019-03-09]. Dostupné z: <https://www.acidoshumicos.com/en/leonardite/>
- [4] VESELÁ, L., M. KUBAL, J. KOZLER a P. INNEMANOVÁ. Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu. *Chemické listy*. 2005, **99**, 711-717.
- [5] MCCARTHY, M. a D. BRONK. Analytical Methods for the Study of Nitrogen. *Nitrogen in the Marine Environment* [online]. 1st August 2008. Elsevier, 2008, s. 1219-1275 [cit. 2018-11-05]. DOI: 10.1016/B978-0-12-372522-6.00028-1. ISBN 9780123725226.
- [6] HAVELCOVÁ, M., J. MIZERA, V. MACHOVIČ, O. PŘIBYL, L. BORECKÁ a I. KRAUSOVÁ. Sorbenty na bázi huminových látek a chitosanu. *Chemické listy*. 2011, (105), 913-917.
- [7] SKOKANOVÁ, M. a K. DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Původ a struktúra. *Chemické listy*. 2008, (102), 262-268.
- [8] ENEV, V. *Spektrometrické metody pro výzkum huminových látek*. Brno, 2015, 131 s. (přílohy 77 s.). Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [9] NIEDER, R. a D.K. BENBI. *Carbon and Nitrogen in the Terrestrial Environment*. Springer Science & Business Media, 2008, 430 s. ISBN 978-1-4020-8432-4.
- [10] PICCOLO, A. *Humic substances in terrestrial ecosystems*. New York: Elsevier, 1996. ISBN 978-0-444-81516-3.
- [11] PITTER, P. *Hydrochemie*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1981, 373 s. ISBN 04-636-81.
- [12] PITTER, P. *Hydrochemie*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009. ISBN 978-80-7080-701-9.
- [13] Fulvic acid. *Chemical Book* [online]. 2017 [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB4855060.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4855060.htm)
- [14] TAN, K. *Principles of soil chemistry*. 4th ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2011. Books in soils, plants, and the environment. ISBN 978-1-4398-1392-8.

- [15] RUTKOWSKA, A. a D. PIKU. Effect of Crop Rotation and Nitrogen Fertilization on the Quality and Quantity of Soil Organic Matter. *Soil Processes and Current Trends in Quality Assessment*. InTech, 2013. DOI: 10.5772/53229. ISBN 978-953-51-1029-3.
- [16] TAN, K. *Humic matter in soil and the environment: principles and controversies*. Second edition. Boca Raton, FL: CRC Press, 2014. Books in soils, plants, and the environment. ISBN 978-1-4822-3445-9.
- [17] PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in agronomy*. Vol. 75. New York: Academic Press, 2002, s. 57-134. ISBN 978-0-1200-0793-6.
- [18] SCHNITZER, M. a S. KHAN. *Soil organic matter*. Vol. 8. New York: distributors for the U.S. and Canada, Elsevier/North-Holland, 1978. ISBN 0-444-4 16 10-2.
- [19] KLÖCKING, R., B. HELBIG, A. STEINBÜCHEL a M. HOFRICHTER. Humic Substances, Medical Aspects and Applications of. *Biopolymers Online*. Weinheim, Germany, 2005. DOI: 10.1002/3527600035.bpol1013. ISBN 3527600035.
- [20] PENA-MENDEZ, M., J. HAVEL a J. POTOČKA. Humic substances-compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of applied biomedicine*. 2005, **1**(3), 13-24. ISSN 1214-0287.
- [21] Huminové látky. *AGROPRESS* [online]. b.r. [cit. 2019-03-04]. Dostupné z: <http://www.agropress.cz/huminove-latky/>
- [22] Huminové látky. *Envi Produkt* [online]. Praha, b.r. [cit. 2019-03-04]. Dostupné z: <http://www.enviprodukt.cz/huminove-latky>
- [23] JANSEN, S. A., M. MALATY, S. NWABARA, E. JOHNSON, E. GHABBOUR, G. DAVIES a J. M. VARNUM. Structural modeling in humic acids. *Materials Science and Engineering: C*. 1996, **4**(3), 175-179. DOI: 10.1016/S0928-4931(96)00151-8. ISSN 09284931.
- [24] CHEN, Y., N. SENESI a M. SCHNITZER. Information Provided on Humic Substances by E4/E6 Ratios1. *Soil Science Society of America Journal*. 1977, **41**(2). DOI: 10.2136/sssaj1977.03615995004100020037x. ISSN 0361-5995.
- [25] PEURAVUORI, J. a K. PIHLAJA. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Analytica Chimica Acta*. 1997, **337**(2), 133-149. DOI: 10.1016/S0003-2670(96)00412-6. ISSN 00032670.
- [26] KORSHIN, G., Ch. LI a M. BENJAMIN. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: A consistent theory. *Water Research*. 1997, **31**(7), 1787-1795. DOI: 10.1016/S0043-1354(97)00006-7. ISSN 00431354.

- [27] HAY, M. a S. MYNENI. Structural environments of carboxyl groups in natural organic molecules from terrestrial systems. Part 1: Infrared spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2007, **71**(14), 3518-3532. DOI: 10.1016/j.gca.2007.03.038. ISSN 00167037.
- [28] BAES, A. a P. BLOOM. Diffuse Reflectance and Transmission Fourier Transform Infrared (DRIFT) Spectroscopy of Humic and Fulvic Acids. *Soil Science Society of America Journal*. 1989, **53**(3). DOI: 10.2136/sssaj1989.03615995005300030008x. ISSN 0361-5995.
- [29] GARDEA-TORRESDEY, J.L., L. TANG a J.M. SALVADOR. Copper adsorption by esterified and unesterified fractions of Sphagnum peat moss and its different humic substances. *Journal of Hazardous Materials*. 1996, **48**(1-3), 191-206. DOI: 10.1016/0304-3894(95)00156-5. ISSN 03043894.
- [30] SEDLÁČEK, P., J. SMILEK a M. KLUČÁKOVÁ. How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – 2. Non-stationary diffusion experiments. *Reactive and Functional Polymers*. 2014, **75**, 41-50. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2013.12.002. ISSN 13815148.
- [31] SCHNITZER, M a I HOFFMAN. Thermogravimetry of soil humic compounds. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1965, **29**(8), 859-870. DOI: 10.1016/0016-7037(65)90083-9. ISSN 00167037.
- [32] NOVÁK, F. a R. HRABAL. Kvantitativní <sup>13</sup>C NMR spektroskopie huminových látek. *Chemické listy*. Praha, 2011, (105), 752-760.
- [33] NOVÁK, F., M. ŠESTAUBEROVÁ a R. HRABAL. Structural features of lignohumic acids. *Journal of Molecular Structure*. 2015, **1093**, 179-185. DOI: 10.1016/j.molstruc.2015.03.054. ISSN 00222860.
- [34] BARTLE, K., A. POMFRET, A. PAPPIN, D. MILLS a H. EVLIYA. Analysis of methylated humic acids from fossil fuels by size exclusion chromatography and NMR. *Organic Geochemistry*. 1987, **11**(3), 139-149. DOI: 10.1016/0146-6380(87)90017-9. ISSN 01466380.
- [35] SPACCINI, R., V. COZZOLINO, V. DI MEO, D. SAVY, M. DROSOS a A. PICCOLO. Bioactivity of humic substances and water extracts from compost made by ligno-cellulose wastes from biorefinery. *Science of The Total Environment*. 2019, **646**, 792-800. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.334. ISSN 00489697.



- [36] RODRÍGUEZ, F., P. SCHLENGER a M. GARCÍA-VALVERDE. A comprehensive structural evaluation of humic substances using several fluorescence techniques before and after ozonation. Part I: Structural characterization of humic substances. *Science of The Total Environment*. 2014, **476-477**, 718-730. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.11.150. ISSN 00489697.
- [37] DOSKOČIL, L., J. BURDÍKOVÁ-SZEWIECZKOVÁ, V. ENEV, L. KALINA a J. WASSERBAUER. Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites. *Fuel*. 2018, (213), 123-132. DOI: 10.1016/j.fuel.2017.10.114. ISSN 00162361.
- [38] SIERRA, M.M.D., M. GIOVANELA, E. PARLANTI a E.J. SORIANO-SIERRA. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere*. 2005, **58**(6), 715-733. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.09.038. ISSN 00456535.
- [39] GIOVANELA, M., E. PARLANTI, E. J. SORIANO-SIERRA, M. S. SOLDI a M. M. D. SIERRA. Elemental compositions, FT-IR spectra and thermal behavior of sedimentary fulvic and humic acids from aquatic and terrestrial environments. *GEOCHEMICAL JOURNAL*. 2004, **38**(3), 255-264. DOI: 10.2343/geochemj.38.255. ISSN 0016-7002.
- [40] CHEN, J., B. GU, E. J. LEBOEUF, H. PAN a S. DAI. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere*. 2002, **48**(1), 59-68. DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00041-3. ISSN 00456535.
- [41] GRASSET, L a A AMBLÈS. Structure of humin and humic acid from an acid soil as revealed by phase transfer catalyzed hydrolysis. *Organic Geochemistry*. 1998, **29**(4), 881-891. DOI: 10.1016/S0146-6380(98)00193-4. ISSN 01466380.
- [42] CHANG, R., R. MYLOTTE, M. HAYES, R. MCLNERNEY a Y. TZOU. A comparison of the compositional differences between humic fractions isolated by the IHSS and exhaustive extraction procedures. *Naturwissenschaften*. 2014, **101**(3), 197-209. DOI: 10.1007/s00114-013-1140-4. ISSN 0028-1042.
- [43] SIMONETTI, G., O. FRANCIOSO, S. NARDI, A. BERTI, E. BRUGNOLI a E. F. MORARI. Characterization of Humic Carbon in Soil Aggregates in a Long-term Experiment with Manure and Mineral Fertilization. *Soil Science Society of America Journal*. 2012, **76**(3), 880-890. DOI: 10.2136/sssaj2011.0243. ISSN 0361-5995.
- [44] BAIGORRI, R., M. FUENTES, G. GONZÁLEZ-GAITANO, J. GARCÍA-MINA, G. ALMENDROS a F. GONZÁLEZ-VILA. Complementary Multianalytical Approach To Study the Distinctive Structural Features of the Main Humic Fractions in Solution: Gray Humic Acid, Brown Humic Acid, and Fulvic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, **57**(8), 3266-3272. DOI: 10.1021/jf8035353. ISSN 0021-8561.

- [45] SCHMEIDE, K., S. SACHS, M. BUBNER, T. REICH, K. HEISE a G. BERNHARD. Interaction of uranium(VI) with various modified and unmodified natural and synthetic humic substances studied by EXAFS and FTIR spectroscopy. *Inorganica Chimica Acta*. 2003, **351**, 133-140. DOI: 10.1016/S0020-1693(03)00184-1. ISSN 00201693.
- [46] MAO, J-D., W-G. HU, K. SCHMIDT-ROHR, G. DAVIES, E. A. GHABBOUR a B. XING. Quantitative Characterization of Humic Substances by Solid-State Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance. *Soil Science Society of America Journal*. 2000, **64**(3), 873-884. DOI: 10.2136/sssaj2000.643873x. ISSN 1435-0661.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

$^{13}\text{C}$ NMR	$^{13}\text{C}$ spektrometrie nukleární magnetické rezonance
BiA	parametr biologické účinnosti
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOM	rozpuštěná organická hmota ( <i>Dissolved Organic Matter</i> )
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
DRIFT	difuzní reflektance
EA	elementární analýza
EEM	excitačně-emisní matice (spektra)
FK	fulvinová kyselina
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
HK	humínová kyselina
HL	humínové látky
HU	humin
IHSS	mezinárodní společnost pro výzkum humínových látek
OM	organická hmota
PCB	polychlorované bifenylly
PVC	polyvinylchlorid
TGA	termogravimetrická analýza
UV/Vis	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření